Die Bestimmung der Östrogenreceptoren (8S-Komponente) im Cytosol des humanen Myometriums mit Hilfe der Sephadexgelchromatographie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt von

Hannes Wenk

aus

Solingen

Bonn 1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546506_0040

Die Bestimmung der Östrogenreceptoren (8S-Komponente) im Cytosol des humanen Myometriums mit Hilfe der Sephadexgelchromatographie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt von

Hannes Wenk

aus

Solingen

Bonn 1979

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. O. Bellmann
2. Gutachter: Prof. Dr. G. S. Rao

Aus der Universitäts-Frauenklinik Bonn,
Direktor: Professor Dr. E. J. Plotz

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Hövelborn Druck und Verlag G.m.b.H. Seehofstraße 17, D-5200 Siegburg ∅ (02241) 6 53 00

Inhalt: Seite

I. Einleitung 6

1. Historie 6
2. Charakterisierung des Östrogenreceptors 7
3. Biologische Wirkung der Östradiol-Receptor-bindung 10
4. Pathophysiologische Bedeutung der Östrogen-receptoren 12

II. Methodischer Teil 18

1. Reagenzien 18
   a) Steroide und steroidähnliche Substanzen 18
   b) nicht steroidale Substanzen 18
2. Materialien und Geräte 28
3. Herstellung der Lösungen 28
   a) Puffer 28
   b) Steroidlösungen 29
   c) Scintillator 29
4. Herstellung von Sephadexgel und Vorbereitung der Dünnschichtgelchromatographieplatte 29
5. Patientengut 30
6. Gewinnung und Aufarbeitung des Myometriums 31
7. Inkubation des Cytosols 32
8. Trennung von freiem und gebundenem Steroid mittels Sephadexdünnschichtgelchromatographie 33
9. Radioaktivitätsmessung 34
10. Auswertung 34
11. Quantitative Bestimmung von 40
    a) Protein im Cytosol 40
    b) DNAim Sediment 41
    c) K^+ im Cytosol 41

III. Ergebnisse 43

1. Zur Technik der Gelfiltration 43
   a) Sephadexarten 43
   b) Laufstrecken 45
   c) Neigungswinkel 45
   d) Auftragsvolumina 47
2. Charakterisierung der 8S-Komponente des Östradiolreceptors 47
   a) Einfluß der Inkubationstemperatur 47
   b) Einfluß der Inkubationsdauer 51
   c) Einfluß des pH-Wertes 51
   d) Hitzelabilität des Receptors 55
   e) Haltbarkeit des Receptors bei -20°C 55
   f) Einfluß von Glycerol 55
   g) Einfluß von Äthanol 60
   h) Einfluß von Dithioerythrit 60
   i) Einfluß von KCl 63
3. Kinetik der Östradiolbindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors 63
   a) Einfluß der Bindung im Radioaktivitätsgipfel II 63
   b) Affinität der spezifischen Bindung 67
   c) Kapazität der spezifischen Bindung 70
4. Kompetition an der 8S-Komponente des Östradiolreceptors 70
   a) Mit Östrogenen 70
   b) Mit Gestagenen 72
   c) Mit anderen Steroiden 80
   d) Mit Digitalispräparaten 80
5. Bindung an die 8S.Komponente des Östradiolreceptors unter Berücksichtigung des Funktionszustandes des Endometriums 84

IV. Diskussion 91

1. Zur Methodik 91
2. Zur Kinetik 98
3. Zur Pharmakologie 100
4. Zur Biologie 104

V. Zusammenfassung 107

VI. Literatur 110

I. Einleitung

I. 1. Historie

Die Beobachtung, daß sich Östrogene in ihren Erfolgsorganen anreichern, wurde erstmals 1959 gemacht: Glascock und Hoekstra injizierten radioaktiv markiertes Hexöstrol jungen weiblichen Schafen und Ziegen und fanden eine Anreicherung des Hormons in verschiedenen Organen. Hierzu gehörten Uterus, Vagina, Brustdrüse, Ovar, Tube sowie die mit der Exkretion und dem Metabolismus von Hexöstrol in Zusammenhang stehenden Organe Leber und Niere. 1962 wiesen Jensen und Jacobson eine selektive Anreicherung von radioaktiv markiertem Östradiol in den östrogenabhängigen Organen der Ratte nach. Sie stellten fest, daß Östradiol im Uterus gespeichert und im Gegensatz zur Leber hier nicht metabolisiert wird. Toft et al. homogenisierten Rattenuteri und inkubierten sie anschließend mit radioaktiv markiertem Östradiol. Bei der Dichtezentrifugation des Inkubates stellten sie eine Anreicherung des Hormons in zwei Sedimentationsbereichen fest (Toft u. Gorski 1966, Toft et al. 1967). Auf Grund der Bindungseigenschaften des 9S-Proteins wurde es als Receptorprotein angesprochen, während sich die Bindung im 3S - 5S-Bereich als weniger spezifisch erwies.

Die spezifische Bindung von Östradiol beim Menschen war seit Ende der 60er Jahre Gegenstand der Forschung. 1967 prüften Brush et al. die Verteilung von radioaktivem Östradiol nach i.v. Injektion beim Menschen und bestätigten die im Tierexperiment gefundene Akkumulation im Uterus. Vergleichende Untersuchungen zur spezifischen Bindung von Östradiol in Gewebshomogenaten von Mensch und Tier wurden von Wyss et al. (1968) vorgelegt. Bei dieser Untersuchung, bei der die Eiweißkomponenten durch Dichtezentrifugation voneinander getrennt

wurden, ergab sich erstmals das Problem der Differenzierung zwischen spezifisch bindenden Proteinen des menschlichen Cytosols und den weniger spezifisch bindenden Eiweißen des menschlichen Serums, da beide Eiweißgruppen gleiche Sedimentationseigenschaften aufwiesen. Wyss et al. (1968) trennten die Proteine vor der Dichtezentrifugation, indem sie die weniger spezifisch bindenden Eiweiße mit Krebs-Ringer-Henseleit-Glukose-Puffer auswuschen. Jungblut et al. (1970) setzten als Reinigungsschritt vor die Dichtegradientenzentrifugation die Fraktionierung mit Amoniumsulfat.Mehrere Methoden werden zur Trennung der spezifisch bindenden Eiweiße von Verunreinigungen und weniger spezifisch bindenden Eiweißen eingesetzt. Von diesen haben sich folgende bewährt: Sephadexgelchromatographie (Puca u. Brescani 1968), Agargelektrophorese (Wagner 1972), Adsorption an Aktivkohle (Korenman 1969) oder an Glasstaub (Clark u. Gorski 1969) und die Fällung des Hormon-Receptorkomplexes mit Protaminsulfat (Steggles u. King 1970).

Nachdem mit diesen Methoden die Darstellung des Receptors gelungen war, konnten seine Eigenschaften ausführlich untersucht werden.

I.2. Charakterisierung des Östrogenreceptors

Im Gegensatz zu der spezifischen Bindung von Proteohormonen, die an der Zellmembran erfolgt, spielt sich die spezifische Bindung der Steroidhormone ausschließlich im Zellinneren ab. Die Klärung der Frage nach der intrazellulären Lokalisation der Östradiolreceptoren leitete Stumpf (1968) durch autoradiographische Untersuchungen nach systemischer Gabe von radioaktiv markiertem Östradiol ein. Er fand, daß 70% des Hormons im Kern und 30% im Cytoplasma der Uteruszelle der Ratte reteniert wurden. Dieser Verteilungsmodus erwies sich

in vitro temperaturabhängig. Jensen et al. (1969) zeigten bei in-vitro-Studien, die bei einer Inkubationstemperatur von 37°C durchgeführt wurden, daß 20%-25% der Radioaktivität in der Cytosolfraktion des Uterus vorlag. Wurde die in vitro-Inkubation des Organs mit Östradiol bei 2°C ausgeführt, so erhöhte sich der Prozentsatz des Hormons im Cytosol auf mehr als 75%. Schloß man an die Inkubation bei 2°C eine bei 37°C an, so zeigte sich bereits nach 15 Minuten eine Rückverteilung der Radioaktivität in die Kernfraktion.

Die Sedimentationseigenschaften des cytoplasmatischen Receptors hängen entscheidend von der Kaliumionenkonzentration des Inkubationsmediums ab (Korenman u. Rao 1968; Erdos 1968). Bei Kaliumionenkonzentrationen, wie sie üblicherweise in der Zelle vorkommen -96 mVal/l - 125 mVal/l (Biochemisches Taschenbuch 1956)-, sedimentiert der Receptor im 8S-Bereich. Bei Erhöhung der Kaliumionenkonzentration spaltet sich der Receptor in Untereinheiten auf, die dann im 4S-Bereich sedimentieren. Dieser Vorgang ist in Abhängigkeit von der Kaliumionenkonzentration reversibel. Die 4S-Komponente, die sich in einem K^+-haltigen Medium aus dem 8S-Receptor bildet, ist in der Lage, sich in eine 5S-Komponente umzuwandeln, wenn das Cytosol kurzfristig auf 25°C erwärmt wird (Brecher et al. 1970; Gschwendt u. Hamilton 1972). Diese Änderung der Sedimentationseigenschaft des 4S-Cytosolreceptors läßt sich nur in Gegenwart von Östradiol nachweisen. Milgrom et al. (1973) bezeichneten diesen Vorgang im Hinblick auf die Translokation der 5S-Komponente vom Cytoplasma in den Zellkern als"azidophile Aktivierung".

Die Bildung eines 8S-Östradiol-Receptorkomplexes ist die Voraussetzung für den Nachweis des 5S-Receptors im Kern. Eine spezifische Bindung im Kern läßt sich nur nachweisen, wenn das Hormon systemisch gegeben wurde, oder die Inkubation in Gegenwart von Cytosol stattfand. Wird die Bindungsfähig-

keit der 8S-Komponente im Cytosol durch kurzfristiges Erwärmen auf 45°C zerstört, so hat dies zur Folge, daß ein 5S-Östradiol-Receptorkomplex aus dem Kern nicht extrahierbar ist (Toft et al. 1967; Jensen et al. 1968; Musliner et al. 1970). Es erfolgt somit nach Aufnahme des Hormons in die Zelle zunächst eine Bindung an den cytoplasmatischen Receptor. Die Bindung bewirkt unter in-vivo-Bedingungen eine Änderung der Eigenschaften des Receptors, der dann im 5S-Bereich sedimentiert. Dieser Vorgang ist mit einer entsprechenden Verminderung des Gehaltes an 8S-Receptoren im Cytosol verbunden. Mit der Änderung des Sedimentationsverhaltens ändert sich auch die elektrische Ladung des Receptors derart, daß positive Valenzen an seiner Oberfläche erscheinen, die ihn befähigen mit Polyanionen, z.B. DNA, in Wechselwirkung zu treten (Milgrom et al. 1973). Offensichtlich wird Östradiol in Form des 5S-Östradiol-Receptorkomplexes in den Zellkern transportiert.

Das Östradiol spezifisch bindende Makromolekül, der Receptor, läßt sich zumindestens im Bereich seines aktiven Zentrums als Eiweiß charakterisieren. Es verliert seine Funktion, wenn es mit Pronase oder Trypsin inkubiert wurde, nicht jedoch in Gegenwart von Nucleasen (Toft u. Gorski 1966). Es verliert seine Funktion durch Erhitzen auf 60°C (Toft et al. 1967). Daß Sulfhydrylgruppen für die Funktion wesentlich sind, geht aus der Tatsache hervor, daß Sulfhydrylgruppen blockierende Substanzen zu einer starken Reduktion der Östradiolbindung im Cytosol führen (Hähnel 1971). Das Molekulargewicht des Receptors, bestimmt durch die Saccharosedichtezentrifugation, betrug 238000. Es wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, daß der Receptor in seiner 8S-Form vorlag (Puca et al. 1971).

I.3. Biologische Wirkung der Östradiol-Receptor-Bindung

Nach systemischer Gabe von Östradiol lassen sich am Uterus der Ratte charakteristische Veränderungen biochemischer und morphologischer Art feststellen. Diese Veränderungen laufen in einer zeitlich gestaffelten Reihenfolge ab, an deren Ende das Uteruswachstum steht (Übersicht bei Brökelmann 1977). Bereits wenige Sekunden nach intravenöser Östradiolgabe kommt es nach Jensen und Jacobson (1962) zur Bindung von Östradiol an den Receptor im Cytosol. Innerhalb der nächsten 1-2 Minuten findet eine Receptortranslokalisation in den Zellkern statt (Williams u. Gorski 1972). Bereits 25 Sekunden nach intravenöser Hormongabe ist mikroskopisch eine Vasodilatation festzustellen (Szego 1971). 30-60 Minuten nach der Östradiolapplikation kommt es im Uterus zur Synthese eines Proteins, das auch als "induziertes Protein" bezeichnet wird (Barnea et al. 1970). Die Synthese der für die Bildung des "induzierten Proteins" verantwortlichen RNA beginnt nach 10 Minuten (DeAngelo u. Gorski 1970; Katzenellenbogen u. Gorski 1972). Zu diesem Zeitpunkt ist eine Zunahme der Ribosomen zu bemerken. Nach sechs Stunden hat das Trockengewicht des Uterus zugenommen, und eine Zellhypertophie zeichnet sich ab (Mueller et al. 1958). Sehr viel später, nämlich 16-18 Stunden nach Östradiolgabe ist eine Neusynthese von DNA und Histonen im Zellkern festzustellen (Kaye et al. 1972; Anderson et al. 1971). Die Mitoserate ist gesteigert. Zu diesem Zeitpunkt ist die Gewichtszunahme des Uterus nicht mehr allein auf eine Zellhypertrophie, sondern auch auf eine Zellhyperplasie zurückzuführen.

Zur Erklärung der sehr frühen und frühen Reaktionen können die Untersuchungen von Szego (1971) herangezogen werden. Er fand bei Ratten wenige Sekunden nach Östradiolgabe eine Erhöhung des Histaminspiegels. Histamin kann für die sehr frühe Erweiterung der Kapillaren und die Wassereinlagerung verant-

wortlich gemacht werden. 15 Sekunden nach Östradiolgabe kann zyklisches AMP vermehrt nachgewiesen werden. Zyklisches AMP dürfte als Aktivator der Proteinkinasen für die frühen Stoffwechselreaktionen verantwortlich sein. Diese Reaktionen sind also wohl nicht als Ausdruck einer direkten Wechselwirkung zwischen Östradiol-Receptorkomplex und Zellkern aufzufassen, sondern möglicherweise auf eine direkte Beziehung des Östradiols zu anderen extra- oder intrazellulären Strukturen als dem Receptor zurückzuführen. Die weiteren Reaktionen sind dagegen eindeutig auf eine Wechselwirkung zwischen Östradiol-Receptorkomplex und Zellkern zurückzuführen.

Es ist anzunehmen, daß die Interaktion zwischen Östradiol-Receptorkomplex und dem Kern sowohl fördernd als auch hemmend auf den Informationsfluß vom Zellkern in das Cytoplasma einwirken kann. Es ist erwiesen, daß sie die Synthese spezifischer RNA hervorruft, die dann für die Synthese von Proteinen verantwortlich ist. Möglicherweise kann sie auch repressorisch auf das Genom einwirken. Dafür spricht die Beobachtung von Stormshak et al. (1976) die besagt,daß mit sehr hohen Östradioldosen keine spezifischen Veränderungen bei der Ratte zu erzielen sind. Weitere Unterstützung erfährt diese Hypothese dadurch, daß die Zufuhr von hohen Östradioldosen beim metastasierenden Mammakarzinom mit eindeutig nachgewiesenem Receptorbestand zu einer Tumorregression führt (McGuire et al. 1976).

Es stellt sich weiterhin die Frage, ob die volle Wirkung von Östradiol auf das Erfolgsorgan nur bei ständiger Präsenz des Hormons auftritt (sustained output-Theorie) oder dadurch zustande kommt, daß eine relativ kurzfristige Interaktion zwischen Östradiol und Receptor eine Reaktion auslöst, die dann für die Spätreaktionen verantwortlich ist (Domino-Theorie). Gegen die Domino-Theorie sprechen die Ergebnisse von Gorski und Racker (1974): Östriol führt zwar zu denselben Frühreak-

tionen wie Östradiol, die späten Reaktionen sind durch Östriol aber nur dann zu erreichen, wenn es fortlaufend in kurzen zeitlichen Abständen appliziert wird. Der Umsatz von Östriol am Receptorkomplex bzw. im Kern ist so beschleunigt, daß ein ausreichend hoher Hormonspiegel und damit eine Wirkung in Form der späten Reaktionen nur dann zu erzielen ist, wenn Östriol in kurzen Abständen gegeben wird.

I.4. Pathophysiologische Bedeutung der Östradiolreceptoren

In der Reproduktionsphase der Frau unterliegt die Konzentration der Östradiolreceptoren in den Genitalorganen zyklusabhängigen Schwankungen. Zu Beginn des Zyklus weist der Receptorgehalt des Endometriums ein Maximum auf, um während der Sekretionsphase bis zur Menstruationsblutung kontinuierlich abzunehmen (Evans et al. 1974). Gleiches konnte für das Myometrium gezeigt werden (Trams et al. 1973).Das Endometrium in der Postmenopause weist einen ähnlich hohen Receptorgehalt auf wie das in der Proliferationsphase (Evans et al. 1974).

Auch während der Gravidität weisen die Östradiolreceptoren im Uterus ein charakteristisches Verhalten auf. Bei schwangeren Rattenuteri zeigte sich eine Vermehrung der Östradiolreceptoren in der Muskulatur im Bereich der Implantationsstelle. Der Östradiolreceptorbestand in der übrigen Muskulatur war, verglichen mit dem der Implantationsstelle, während der gesamten Schwangerschaft gering (Feherty et al. 1970). Im Gewebe des schwangeren humanen Uterus wurde eine kontinuierliche Abnahme des Receptorbestandes bis zur 18ten Gestationswoche beschrieben (Henderson u. Schalch 1972). Im weiteren Schwangerschaftsverlauf ließ sich eine spezifische Bindung von Östradiol im Cytosol des Uterus nicht mehr nachweisen.

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen über den Östradiol-Receptorbestand in pathologisch verändertem Gewebe des Ge-

nitalbereichs der Frau. Im Endometriumkarzinom wiesen Crocker et al. (1974) und Pollow et al. (1975) Östrogenreceptoren nach. Der Gehalt an Östrogenreceptoren entspricht nach Croker et al. (1974) demjenigen der späten Follikel- bzw. frühen Lutealphase. Die Receptorkonzentration war bei den von Pollow et al. (1975) untersuchten Kollektiven am höchsten beim undifferenzierten Karzinom. Das Durchschnittsalter der Patientinnen lag in dieser Studie bei 64,2 Jahren. Bei der adenomatös-cystischen Hyperplasie des Endometriums fanden Milton et al. (1973) einen im Vergleich zum normalen Endometrium der Proliferationsphase leicht erhöhten Receptorbestand. Crocker et al. (1974) fanden den Receptorbestand bei der glandulär-cystischen Hyperplasie geringer als in der Proliferationsphase. In den von Gabb u. Stone (1974) untersuchten Leiomyomen des Uterus zeigte sich kein Unterschied zu normalem Myometrium.

Es ist davon auszugehen, daß die oben genannten pathologisch veränderten Gewebe einem verstärkten Östradioleinfluß ausgesetzt sind. So findet sich die glandulär-cystische Hyperplasie bei Follikelpersistenz, die eine verlängerte Östradioleinwirkung auf die Schleimhaut mit sich bringt. In der Ätiologie des Corpuscarcinoms wird eine gesteigerte Östradiolproduktion im Fettgewebe der adipösen Patientin diskutiert. Myome zeigen vor allem während des Klimakteriums, in dem mit einem Versagen der Gelbkörperfunktion zu rechnen ist, eine vermehrte Wachstumstendenz. Es stellt sich die Frage, ob der Gehalt dieses Gewebes an Östradiolreceptoren in einem Zusammenhang mit ihren Veränderungen, ihrem Wachstum und ihrer hormonellen Beeinflußbarkeit steht.

Der Nachweis von Östradiolreceptoren hat sich von besonders klinischer Bedeutung beim Mammakarzinom erwiesen. Es ist seit langem bekannt, daß ein Teil der metastasierenden Mammakarzinome auf eine Ovarektomie mit einer Verkleinerung der

Tumormasse reagieren (Literatur bei McGuire et al. 1976). Diese Tumoren gehören somit zu den "hormonabhängigen Tumoren". 1961 gelang es Huggins et al., bei Ratten mit Dimethylbenzanthrazen ein Adenokarzinom der Brustdrüse zu induzieren. Dieses experimentell induzierte Karzinom erwies sich ebenfalls als östrogenabhängig (Lee et al. 1975). Die Tumorgröße verkleinerte sich innerhalb 10 Tagen nach Kastration der Ratte um 70%. Hierbei nahm die Östradiolreceptorkonzentration im Cytosol von 225 fmol/mg Protein auf 16 fmol/mg Protein ab. Durch in-vivo-Gabe von Östradiol bei diesen kastrierten weiblichen Ratten konnte der Östradiolreceptorschwund gestoppt und eine hohe Östradiolreceptorkonzentration wieder erreicht werden.

Desgleichen lassen sich in einem Teil der menschlichen Mammakarzinome Östradiolreceptoren nachweisen. Ein Nachweis ist bei etwa 70% der Mammakarzinome möglich (McGuire et al. 1976; Wagner u. Jungblut 1976). Ein solcher Nachweis von Östradiolreceptoren ist von großer klinischer Bedeutung, da eine Beziehung zwischen der Existenz von Östradiolreceptoren und dem Ansprechen des Tumors auf eine hormonelle Therapie besteht. Auf Grund einer Multi-Center-Studie (Übersicht bei McGiure et al. 1976) kann davon ausgegangen werden, daß sich fortgeschrittene Mammakarzinome mit nachgewiesenen Östradiolreceptoren in etwa 60% durch eine hormonelle Therapie in ihrer Progredienz beeinflussen lassen, während bei fehlendem Receptorbestand nur in 8% mit einem Erfolg zu rechnen ist. Zur hormonellen Therapie zählen so unterschiedliche Verfahren wie die additive Hormontherapie mit pharmakologischen Dosen von Östrogenen, Androgenen und Glucocorticoiden, die ablative Hormontherapie durch Kastration, Adrenalektomie und Hypophysektomie und in neuerer Zeit auch die Gabe von Antiöstrogenen.

Ein Nachweis von Östradiolreceptoren im Tumorgewebe führt also einerseits zu einer Selektion von Patientinnen, die auf die hormonelle Therapie ansprechen, andererseits bewahrt er vor einer zeitraubenden Behandlung, die ineffektiv ist. Wahrscheinlich wird das Tumorwachstum nicht nur durch die Östrogenreceptoren gesteuert, sondern durch ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren, unter denen auch verschiedene Hormone eine Rolle spielen können. Zu Hormonreceptoren, die ebenfalls im Mammakarzinom der Frau nachgewiesen wurden, zählt der Progesteronreceptor (McGuire et al. 1976), der Androgenreceptor (Wagner u. Jungblut 1976) und der Prolaktinreceptor im DMBA indizierten Mammakarzinom der Ratte (Turkington 1974). Bei diesen Tumoren wurde der Einbauch von ^{3}H-Leucin in Proteine sowohl durch Östradiol als auch durch Prolaktin gesteigert. Eine gleichzeitige Gabe beider Hormone ließ die Leucininkorporation überproportional ansteigen (Lee et al. 1975). Eine Erklärung hierfür bieten die Befunde von Vignon und Rochefort (1976). Danach führt die Gabe von Prolaktin zu einer Zunahme des Östradiol-Receptorgehaltes beim Mammakarzinom der Ratte. Gelten diese tierexperimentellen Befunde auch für den Menschen, so wird verständlich,daß durch medikamentöse Hemmung der Prolaktinsekretion eine Verlangsamung des Tumorwachstums erreicht werden konnte.

I.5. Zielsetzung

In Anbetracht der pathophysiologischen Bedeutung, die dem Nachweis von Östradiolreceptoren im menschlichen Gewebe zukommt, ist es notwendig, daß in der Klinik eine Methode zum Nachweis von Östradiolreceptoren zur Verfügung steht. Nach den Untersuchungen von Wittliff et al. (1976) reicht eine Bestimmung des Gesamtreceptorbestandes offenbar nicht aus, um eine Aussage über die hormonale Therapierbarkeit eines Brustdrüsenkarzinoms machen zu können. Eine Differenzierung in 4S-Komponente und 8S-Komponente ist danach von klinischer Re-

levanz, da sich ein besonders enger Zusammenhang zwischen dem Gehalt an 8S-Receptoren und dem Therapieerfolg einer Hormonbehandlung nachweisen ließ. Tumoren, bei denen die 8S-Komponente den Hauptteil des Gesamtreceptorbestandes darstellte, sprachen zu 78% auf eine hormonelle Therapie an; stellte die 4S-Komponente den Hauptanteil dar, so war eine hormonelle Therapie nicht erfolgreich (Wittliff et al. 1976). Diese Ergebnisse müssen jedoch auf Grund der geringen Fallzahl als vorläufig angesehen werden, so daß eine weitere Abklärung der klinischen Bedeutung der 8S-Komponente des Östradiolreceptors notwendig erscheint.

Ziel dieser Studie war es, eine Methode aufzubauen, mit der die 8S-Komponente des Östradiolreceptors quantitativ bestimmt werden kann, wobei auch die Analyse aus kleinsten Gewebemengen möglich sein sollte. Hierzu bot sich die Methode der Sephadexgeldünnschichtchromatographie an, welche schon mit Erfolg zum Nachweis der Östrogenreceptoren im Rattengewebe angewandt worden war (Töpert et al. 1974). Der Aufbau dieser Methodik machte umfangreiche Untersuchungen notwendig, so daß als Ausgangsmaterial für östrogenreceptorhaltiges Cytosol Myometrium gewählt wurde, welches bei gynäkologischen Eingriffen in genügenden Mengen gewonnen wird.

Im einzelnen stellten sich folgende Fragen:

1. Sind die methodischen Voraussetzungen, wie sie für die Untersuchungen am Rattengewebe gelten ohne weiteres übertragbar auf die Untersuchungen am menschlichen Gewebe? Insbesondere galt es zu zeigen, daß die verwendete Sephadexart nicht nur zur Trennung von gebundener und freier Radioaktivität, sondern auch zur Abtrennung der 8S-Komponente des Östradiolreceptors geeignet ist.
2. Welches sind die optimalen Bedingungen zum Nachweis der 8S-Komponente des Östradiolreceptors im Cytosol des menschlichen Myometriums? Besondere Beachtung galt der

Stabilität des Receptors und dem Einfluß der K^+-Konzentration auf das spezifisch bindende Eiweiß.

3. Ist die Affinität der mit der Methode der Dünnschichtgelchromatographie untersuchten 8S-Komponente des Östradiolreceptors im menschlichen Myometrium mit der Affinität von Östradiolreceptoren anderer Studien vergleichbar, die sich von dieser durch die Methodik oder durch das Untersuchungsmaterial unterscheiden? Hierbei erfolgte die Berechnung der Affinität nach der Methode von Scatchard (1949).
4. Wie groß ist die Substratspezifität der 8S-Komponente des Östradiolreceptors? Zu diesem Zweck wurde die Kompetition verschiedener Östrogene, Gestagene, Androgene, Glucocorticoide und Digitalisglycoside mit Östradiol um die Bindung an der 8S-Komponente des Östradiolreceptors untersucht.
5. Welches Ausmaß kann die Änderung des Gehaltes der 8S-Komponente des Östradiolreceptors im menschlichen Myometrium in Abhängigkeit von der endokrinen Situation nehmen? Hierbei wurde vor allem den Veränderungen im Zyklus und dem Einfluß der Postmenopause nachgegangen.

II. Methodischer Teil

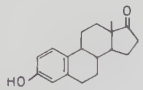
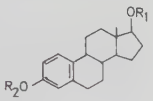
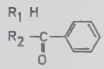
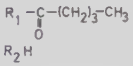
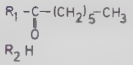
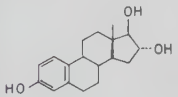
II. 1. Reagenzien

II. 1. a) Steroide und steroidähnliche Substanzen

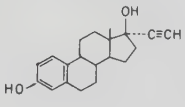
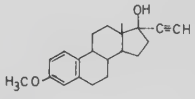
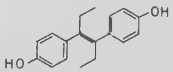
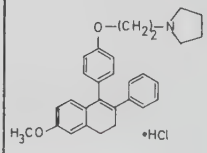
Folgende Steroide wurden verwandt: Östron, Östradiol-17ß. Östriol, 17a-Äthinylöstradiol-17ß, Norgestrel, Norgestrelacetat, Cyproteron, Cyproteronacetat, Mestranol, Dehydroepiandrosteron, Dihydrotestosteron, 5a-Androstandiol in Form seiner vier Stereoisomere, Cortisol und Dexamethason. Als radioaktiv markiertes Steroid wurde 2,4,6,7 (n)- ^{3}H-Östradiol-17ß mit einem Reinheitsgrad von 98% und einer spezifischen Radioaktivität von 85 - 110Ci/mMol in einem Gemisch von Benzol/Äthanol (95 : 5) von der Fa. Amersham bezogen und bei +2^{o}C aufbewahrt. Die nicht radioaktiv markierten Steroide wurden als Reinsubstanz von der Fa. Schering bezogen, die Digitalisderivate von der Fa. Boehringer. Nafoxidine-Hydrochlorid wurde freundlicherweise von der Fa. Upjohn zur Verfügung gestellt. Die Struktur der in der Arbeit verwandten Steroide, Steroidester und steroidähnlicher Substanzen ist aus Tab. 1 ersichtlich.

II. 1. b) Nicht steroidale Substanzen

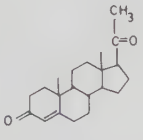
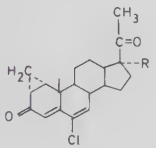
Von der Fa. Merck wurden bezogen: Äthanol, Äthylendinitrotetraessigsäure = EDTA, Benzol, Diphenylamin, 1,4-Dithioerythrit, Essigsäure, Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz, Kaliumchlorid, Perchlorsäure, Phenolrot, 2,2-Phenyl-bis-(5-Phenyloxazol) = POPOP, Naphtalin, Dioxan und Saccharose. 2,5-Diphenyloxazol = PPO stammte von der Fa. Packard, Ferritin, gewonnen aus Pferdemilz von der Fa. K&K Laboratories

Strukturformel	Summen-formel	Molekular-gewicht	Substanz
	$C_{18}H_{22}O_2$	270	Östron 3-Hydroxy-1,3,5(10)- -östratrien-17-on
 R_1 H R_2 H	$C_{18}H_{24}O_2$	272	Östradiol 1,3,5(10)-Östratrien- 3,17ß-diol
	$C_{25}H_{28}O_3$	376	Östradiol-3-benzoat 1,3,5(10)-Östratrien- -3,17ß-diol-3-benzoat
	$C_{23}H_{32}O_3$	356	Östradiol-17ß-valerianat 1,3,5(10)-Östratrien- -3,17ß-diol-17-valerianat
	$C_{25}H_{36}O_3$	384	Östradiol-17ß-önanthat 1,3,5(10)-Östratrien- 3,17ß-diol-17-önanthat
	$C_{18}H_{24}O_3$	288	16α-Östriol 1,3,5(10)-Östratrien- -3,16α,17ß-triol

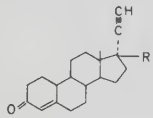
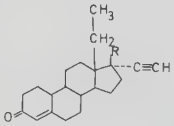
Tab. 1a: Übersicht über die in der Kompetitionsstudie eingesetzten Steroide, Steroidester und steroidähnlichen Substanzen.

Strukturformel	Summenformel	Molekulargewicht	Substanz
	$C_{20}H_{24}O_2$	296	17α-Äthinylöstradiol 17α-Äthinyl-1,3,5(10)-östratrien-3,17β-diol
	$C_{21}H_{26}O_2$	310	Mestranol 17α-Äthinyl-3-methoxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-ol
	$C_{18}H_{20}O_2$	268	Diäthylstilböstrol trans-3,4-Bis(4-hydroxyphenyl)-3-hexen
	$C_{29}H_{32}NO_2Cl$	461	Nafoxidine 1-{2-[4-(6-Methoxy-2-phenyl-3,4-dihydronaphthyl)-phenoxy]-äthyl}-pyrrolidin, Hydrochlorid

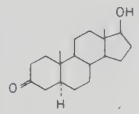
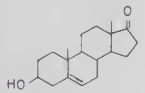
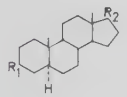
Tab. 1b: Übersicht über die in der Kompetitionsstudie eingesetzten Steroide, Steroidester und steroidähnlichen Substanzen.

Strukturformel	Summenformel	Molekulargewicht	Substanz
	$C_{21}H_{30}O_2$	314	**Progesteron** 4-Pregnen-3,20-dion
 R OH	$C_{22}H_{27}O_3Cl$	374	**Cyproteron** 6-Chlor-17α-hydroxy-1α,2α-methylen-4,6-pregnadien--3,20-dion
 R O–C–CH_3 (O)	$C_{24}H_{29}O_4Cl$	416	**Cyproteronacetat** 17α-Acetoxy-6-chlor-1α,2α--methylen-4,6-pregnadien--3,20-dion

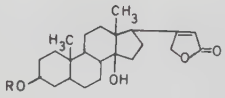
Tab. 1c: Übersicht über die in der Kompetitionsstudie eingesetzten Steroide, Steroidester und steroidähnlichen Substanzen.

Strukturformel	Summenformel	Molekulargewicht	Substanz
			
R OH	$C_{20}H_{26}O_2$	298	Norethisteron
			17α-Äthinyl-17β-hydroxy--4-östren-3-on
R O-C-CH_3 (O)	$C_{22}H_{28}O_3$	340	Norethisteronacetat
			17β-Acetoxy-17α-äthinyl--4-östren-3-on
			
R OH	$C_{21}H_{28}O_2$	312	Norgestrel
			17α-Äthinyl-13β-äthyl-17β--hydroxy-4-gonen-3-on
R O-C-CH_3 (O)	$C_{23}H_{30}O_3$	354	Norgestrelacetat
			17β-Acetoxy-17α-äthinyl--13β-äthyl-4-gonen-3-on

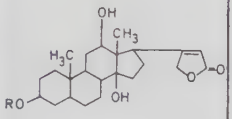
Tab. 1d: Übersicht über die in der Kompetitionsstudie eingesetzten Steroide, Steroidester und steroidähnlichen Substanzen.

Strukturformel	Summenformel	Molekulargewicht	Substanz
	$C_{19}H_{30}O_2$	290	5α-Dihydrotestosteron 17β-Hydroxy-5α-androstan--3-on
	$C_{19}H_{28}O_2$	288	Dehydroepiandrosteron 3β-Hydroxy-5-androsten--17-on
			
R_1 ---OH R_2 ---OH	$C_{19}H_{32}O_2$	292	5α-Androstan-3α,17α-diol
R_1 —OH R_2 —OH	$C_{19}H_{32}O_2$	292	5α-Androstan-3β,17β-diol
R_1 ---OH R_2 —OH	$C_{19}H_{32}O_2$	292	5α-Androstan-3α,17β-diol
R_1 —OH R_2 ---OH	$C_{19}H_{32}O_2$	292	5α-Androstan-3β,17α-diol

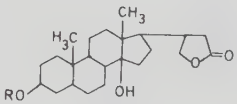
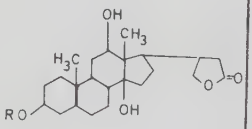
Tab. 1e: Übersicht über die in der Kompetitionsstudie eingesetzten Steroide, Steroidester und steroidähnlichen Substanzen.

Strukturformel	Summenformel	Molekulargewicht	Substanz
			
R –H	$C_{23}H_{34}O_4$	375	Digitoxigenin
R –(Digitoxose)	$C_{29}H_{44}O_7$	505	Digitoxigenin-mono-toxosid
R –(Digitoxose)$_2$	$C_{35}H_{55}O_{10}$	636	Digitoxigenin-bis-toxosid
R –(Digitoxose)$_3$	$C_{41}H_{64}O_{13}$	765	Digitoxin

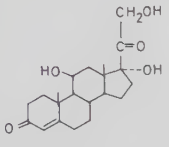
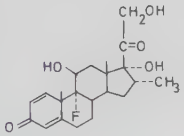
Tab. 1f: Übersicht über die in der Kompetitionsstudie eingesetzten Steroide, Steroidester und steroidähnlichen Substanzen.

Strukturformel	Summenformel	Molekulargewicht	Substanz
			
R –H	$C_{23}H_{34}O_5$	391	Digoxigenin
R –(Digitoxose)	$C_{29}H_{44}O_8$	521	Digoxigenin-mono-digitoxosid
R –(Digitoxose)$_2$	$C_{35}H_{55}O_{11}$	652	Digoxigenin-bis-digitoxosid
R –(Digitoxose)$_3$	$C_{41}H_{64}O_{14}$	781	Digoxin

Tab. 1g: Übersicht über die in der Kompetitionsstudie eingesetzten Steroide, Steroidester und steroidähnlichen Substanzen.

Strukturformel	Summenformel	Molekulargewicht	Substanz
			
R –H	$C_{23}H_{36}O_4$	377	Dihydrodigitoxigenin
R –(Digitoxose)$_3$	$C_{41}H_{66}O_{13}$	767	Dihydrodigitoxin
			
R –H	$C_{23}H_{36}O_5$	393	Dihydrodigoxigenin
R –(Digitoxose)$_3$	$C_{41}H_{66}O_{14}$	783	Dihydrodigoxin

Tab. 1h: Übersicht über die in der Kompetitionsstudie eingesetzten Steroide, Steroidester und steroidähnlichen Substanzen.

Strukturformel	Summenformel	Molekulargewicht	Substanz
	$C_{21}H_{30}O_5$	362	Cortisol 11ß,17,21-Trihydroxy--4-pregnen-3,20-dion
	$C_{22}H_{29}O_5F$	392	Dexamethason 9-Fluor-11ß,17,21-trihydroxy-16α-methyl-1,4--pregnadien-3,20-dion

Tab. 1i: Übersicht über die in der Kompetitionsstudie eingesetzten Steroide, Steroidester und steroidähnlichen Substanzen.

Inc.Planview N.Y. Hollywood California. Ferner fanden Rinderalbumin der Fa. Behring und Herings DNA der Fa. Fluka Verwendung.

II. 2. Materialien und Geräte

Das in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Gewebe wurde in einem Porzellanmörser homogenisiert. Die Fraktionierung des Homogenates in Überstand und Sediment wurde mit einer Beckman-Spinco-L2-50-B-Ultrazentrifuge durchgeführt. Zur Einstellung des pH-Wertes diente ein Beckman pH-Meter-H-3. Die Trennung von freiem und gebundenem Hormon erfolgte auf Glasplatten des Formates 20cm x 40cm, die vorher mit einer Cuprophanmembran der Fa.Technicon belegt worden waren, in einer Dünnschichtgelfiltrationsapparatur der Fa. Pharmacia. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte in einem Tri-Carb-Liquid-Scintillation-Spectrometer-Modell-3380 der Fa. Packard. Absorptionsmessungen wurden an einem Photometer PM der Fa.Zeiss durchgeführt.

II. 3. Herstellung der Lösungen

II. 3. a) Puffer

Der Ansatz des Tris-HCL-Puffers sowie die Einstellung des pH-Wertes erfolgte nach Angaben der wissenschaftlichen Tabellen Geigy (1973). Es wurden folgende Puffer auf Tris-Basis benutzt:

Puffer I: Tris 0,01 molar, pH 7,0
Puffer II: Puffer I + EDTA 0,0015 molar
+ Dithioerythrit 0,001 molar
Puffer III: Puffer I + Saccharose 0,25 molar
Puffer IV: Puffer I,5 % Äthanolgehalt

II. 3. b) Steroidlösungen

Als Stammlösung der Steroide diente eine bei +4°C aufbewahrte 6 x 10^{-5}molare Lösung des Steroids in Benzol/Äthanol (95 : 5). Zur Herstellung einer 6 x 10^{-7}molaren wäßrigen ^{3}H-Östradiollösung mit einem Äthanolgehalt von 5% wurden 0,01 ml Stammlösung entnommen, über Stickstoff eingedampft und in 1,0 ml Puffer IV aufgenommen. Die wäßrigen Lösungen der nicht radioaktiv markierten Steroide wurden ebenfalls aus der oben angegebenen Stammlösung hergestellt. Um eine 6 x 10^{-6} molare Lösung mit 5% Äthanol zu erhalten, dampften wir 0,1 ml der Stammlösung über Stickstoff ein und nahmen sie anschliessend in 1,0 ml Puffer IV auf.

Die weiteren Konzentrationen sowohl der radioaktiv markierten wie auch der nicht markierten wäßrigen Lösungen wurden durch entsprechende Verdünnungsschritte mit Puffer I hergestellt. Auf diese Weise enthielt die gebrauchsfertige Lösung maximal 5% Äthanol, minimal 0,05% Äthanol. Da die Steroidlösung im Inkubat stets 1/10 des Inkubationsvolumens ausmachte, betrug der Äthanolgehalt im Inkubat nur 1/10 desjenigen der gebrauchsfertigen Lösung.

II. 3. c) Scintillator

Der flüssige Scintillator wurde auf Dioxan-Basis hergestellt. Hierzu wurden 100 Gramm Naphthalin, 10 Gramm PPO und 0,25 Gramm POPOP in 1 Liter Dioxan gelöst.

II. 4. Herstellung von Sephadex-Gel und Vorbereitung der Dünnschichtgelchromatographie-Platte

Puffer I diente zur Herstellung des Sephadex-Gels. Hierbei wurden 4,6 g Sephadex G 150 superfine bzw. 9,5 g Sephadex

G 50 superfine in 100 ml Puffer für drei bzw. eine Stunde im Wasserbad bei 97°C zur Quellung gebracht. Durch Erhitzen auf 97°C entwichen alle sichtbaren Luftblasen, so daß eine homogene Verteilung des Gels angenommen werden konnte. Die Aufbewahrung des Gels geschah in einer Plastikflasche mit Schraubverschluß bei 37°C. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde eine mit einer Cuprophanmembran belegte Glasplatte im Format 20cm x 40cm mit Sephadex-Gel beschichtet. Die Cuprophanmembran wurde auf der Platte mit Puffer I zur Quellung gebracht und anschließend mit einer Gummiwalze angepreßt. Danach durften sich keine Luftblasen mehr zwischen der Glasplatte und der Cuprophanmembran befinden. Das Sephadex-Gel wurde in einer Schichtdicke von 0,6mm mittels eines Spezialstabes ausgestrichen. Der Spezialstab gehört zum Zubehör des TLG-Apparates der Fa. Pharmacia. In diesem Apparat wurde die Platte vor der Chromatographie bei +4°C äquilibriert. Eine Verbindung zwischen der mit Sephadex-Gel beschichteten Platte und dem mit Puffer I gefüllten Reservoir stellten Filterstreifen vom Typ Whatman 3 her. Sie lagen ca. zwei Zentimeter breit auf der Gelschicht auf und ragten ca. 2 cm in das Reservoir hinein, so daß ein ungehinderter Übertritt von Puffer in das Gel und umgekehrt möglich war. Die Äquilibrierung erfolgte über einen Zeitraum von mindestens 16 Stunden bei einem Neigungswinkel, bei dem auch die Trennung vorgenommen werden sollte. Üblicherweise betrug der Neigungswinkel zur Horizontalen 20°.

II. 5. Patientengut

Die Untersuchungen zur spezifischen Bindung von ^{3}H-Östradiol im myometranen Gewebe, bei denen zugleich klinische Aspekte berücksichtigt wurden, bezogen sich auf 22 Patientinnen. Das Alter zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 26 und 57 Jahren, im Mittel bei 44 Jahren. 15 Patientinnen wiesen zykli-

sche Ovarialfunktionen auf, sieben Patientinnen befanden sich in der Postmenopause. Die Zuordnung zu einer Zyklusphase bei Patientinnen mit zyklischen Blutungen erfolgte auf Grund der Histologie des Endometriums, die im Pathologischen Institut der Universität Bonn erstellt wurde. Danach befanden sich neun Patientinnen in der Proliferationsphase und sechs Patientinnen in der Sekretionsphase. Vier Patientinnen standen unter Östrogenmedikation, davon befanden sich zwei in der Postmenopause. Die Indikationen, die unabhängig oder in Kombination zur Hysterektomie entweder auf abdominalem oder vaginalem Wege Anlaß gaben, waren folgende:

Myohyperplasie	9 Fälle
Streßinkontinenz	5 Fälle
Ovarialtumor (nicht hormonbildend)	5 Fälle
Descensus uteri et vaginae	5 Fälle

Venöses Blut wurde entweder am Tage vor der Operation oder vor Einleitung der Narkose entnommen. Aliquote Teile des Serums wurden zur Steroidanalytik tiefgefroren.

II. 6. Gewinnung und Aufarbeitung des Myometriums

Vom Beginn der Operation bis zum vollständigen Absetzen des Uterus verging im Durchschnitt eine Stunde. Das Operationspräparat wurde umgehend durch einen an der Seitenwand über das Fundusdach geführten Schnitt eröffnet, so daß genügend Gewebe aus dem Fundusdach entnommen werden konnte. Dieses Gewebe wurde in eiskalten Puffer III gelegt. Alle weiteren Präparationsschritte wurden bei $4^{o}C$ ausgeführt. Nachdem das Endometrium und der Serosaüberzug vom Myometrium abgetrennt worden waren, wurde das Myometrium (ca. 6g) mit einem Skalpell scheibenförmig zerlegt. Die Gewebescheiben wurden in Puffer III von Blutbeimengungen so weit wie möglich freige-

spült. Vor dem Auswägen wurden die Gewebescheiben auf saugfähigem Filterpapier gewendet. Zu dem zerkleinerten Gewebe wurde Puffer II im Verhältnis 1:1 (Volumen:Gewicht)gegeben. Die Homogenisation erfolgte in Anlehnung an die Methode von Trams et al. (1973): Die zerkleinerten Gewebestücke wurden mit Puffer II in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Porzellanmörser gegeben und darin zerstoßen, bis keine zusammenhängenden Gewebeanteile mit bloßem Auge mehr zu erkennen waren und ein Pulver vorlag. Nach Auftauen des so gewonnenen Homogenates bei $4^{o}C$ erfolgte die Fraktionierung in Cytosol und Sediment durch Zentrifugation bei 100 000 x g über 90 Minuten in einer Beckman-Spinco-L2-50B-Ultrazentrifuge. Das Cytosol wurde in aliquoten Teilen von 0,25ml in Eppendorf Reaktionsgefäßen bei $-20^{o}C$ tiefgefroren. Das Sediment wurde in den zur Fraktionierung benutzten Plastikröhrchen verschlossen bei $-20^{o}C$ aufbewahrt.

II. 7. Inkubation des Cytosols

Die Inkubation des Cytosols mit dem Steroid geschah bei $+4^{o}C$ über 120 Minuten. Das Inkubat setzte sich wie folgt zusammen:

1. 80 µl Cytosol
2. 10 µl ^{3}H-Östradiol-17ß-Lösung
3. 10 µl Puffer II oder eine Lösung eines nicht radioaktiv markierten Steroids.

Der Gehalt des Inkubates an Äthanol betrug maximal 0,5%. Die Inkubation wurde dadurch beendet, daß aliquote Teile entnommen und zur Trennung von freiem und gebundenem Steroid auf die mit Sephadex-Gel beschichtete Dünnschichtgelchromatographie-Platte aufgetragen wurden.

II. 8. Trennung von freiem und gebundenem Steroid mittels der Sephadexgel-Dünnschichtchromatographie

Die Aliquote des Inkubates wurden mit einer automatischen Mikropipette aufgetragen. Dazu wurde die im TLG-Apparat äquilibrierte Dünnschichtgelchromatographie-Platte in die Horizontale abgesenkt und ein Schlitz über der Startlinie geöffnet. Der Auftrag der Aliquote von üblicherweise 30 µl erfolgte in einer Breite von 1cm und in einem Abstand von jeweils 3,8cm voneinander an der Startlinie der Dünnschichtgelchromatographie-Platte. Die Startlinie befand sich 5cm von dem oberen Plattenrand entfernt. Zwischen der Seitenkante der Platte und den randständigen Auftragsstellen der Aliquote sowie zwischen den Auftragsstellen der einzelnen Aliquote wurden in Höhe der Startlinie jeweils 5 µl Phenolrot und 5 µl Ferritin nacheinander punktförmig aufgetragen. Auf diese Weise konnte auf einer 20 cm breiten Platte eine Trennung von fünf Aliquoten in freies und gebundenes Steroid vorgenommen werden. Zur Trennung wurde der TLG-Apparat mit der Platte wieder in einen Neigungswinkel von 20^{o} zur Horizontalen gebracht, nachdem die Auftragsöffnung verschlossen war. Die Dünnschichtgelchromatographie war beendet, wenn das Ferritin eine Laufstrekke von mindestens 16 cm und das Phenolrot eine Laufstrecke von ca. 4,5 cm zurückgelegt hatte. Sodann wurde die Platte aus dem TLG-Apparat herausgenommen und bei 40^{o}C und 560 Torr im Trockenschrank nur so lange getrocknet, daß in jedem Fall Sephadex-Gel und Cuprophanmembran mit einem scharfen Skalpell mühelos in Streifen zu schneiden waren. Die Trocknungszeit betrug erfahrungsgemäß bei G 50 superfine 40 min, bei G 150 superfine 70 min. Der Belag der Glasplatte wurde unter Verwendung einer Schablone in Querstreifen von 0,5 cm Breite zerlegt. Von der Startlinie aus ergaben sich so insgesamt 35 Querbahnen. Anschließend wurde der Belag in Längsrichtung in 5 Bahnen zerlegt, wobei die Schnitte durch die zugehörigen farbigen Markierungssubstanzen geführt wurden. Mit einer Pin-

zette wurden die 0,5 cm breiten und 3,8 cm langen Streifen von Sephadex-Gel auf Cuprophanmembran von der Platte abgehoben und in Plastikgefäße der Fa. Packard, in die 0,5 ml Wasser vorgegeben waren, zur Scintillationsmessung überführt. Die Abbildung 1 zeigt die räumlichen Verhältnisse auf der Dünnschichtgelchromatographie-Platte nach Zerlegung des Belages, vor Absammeln der Streifen.

II. 9. Radioaktivitätsmessung

45 Minuten nach Überführung der Sephadexstreifen in die mit 0,5 ml Wasser gefüllten Packardgefäße wurden 10 ml Scintillationsflüssigkeit in jedes Gefäß gegeben. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Packard Liquid-Scintillation-Spectrometer-Modell-3380. Es wurde die automatische Einrichtung des Gerätes zur Messung von Tritium benutzt, bei der das Impulshöhenspektrum 45% betrug und die Fensterbreite von 50 eV bis 1000 eV begrenzt war. Der Background betrug 15 cpm. Die mit einem Standard verglichene Zählausbeute für Tritium betrug bei dieser Einstellung und bei Verwendung des oben angegegebenen Scintillators 30,3% (A.E.S.: 0.83). Bei einem durch 0,5ml Wasser und Sephadexgel hervorgerufenen A.E.S. von 0,75 betrug sie 25%. Die Proben wurden über eine Dauer von fünf Minuten gemessen.

II. 10. Auswertung

Abb. 2 zeigt eine typische Verteilung der Radioaktivität auf der Bahn nach Chromatographie auf Sephadex G 150 superfine. Es lassen sich drei Abschnitte voneinander unterscheiden, in denen die Radioaktivität besonders angereichert ist: Abschnitt I betrifft die Fraktionen 6 - 12 und enthält das freie Hormon. Die Abschnitte II, zwischen den Fraktionen 14 und 20,

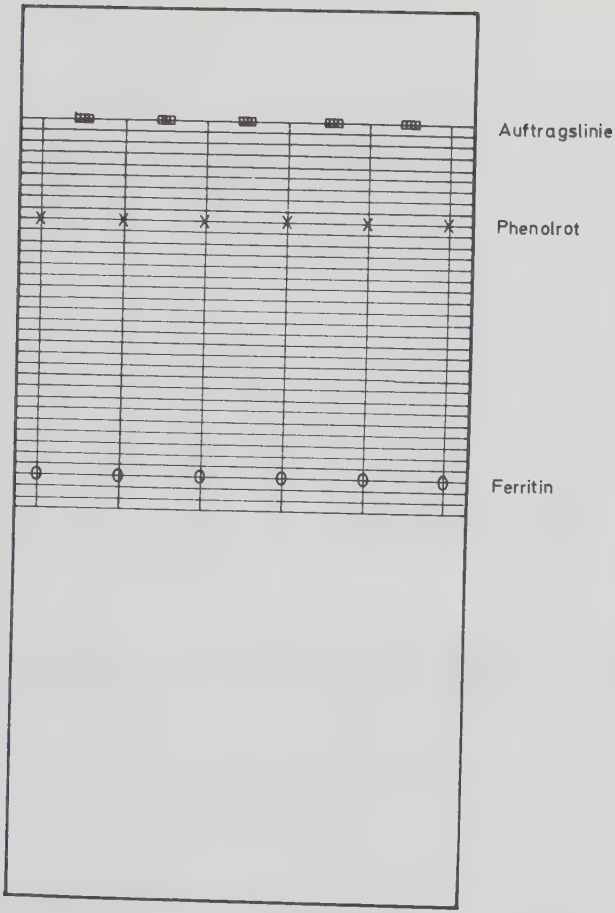


Abb. 1: Schnittmuster nach Gelchromatographie auf Sephadex G 150 superfine

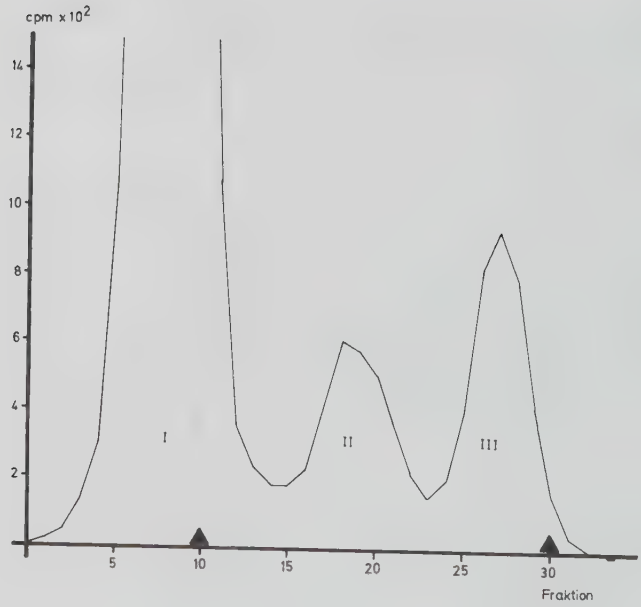


Abb. 2: Trennung von freiem und gebundenem Östradiol durch Gelchromatographie auf Sephadex G 150 superfine.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 70 mit einem Proteingehalt von 15,7 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8}molar; 4°C; 120 min.
Abschnitt I: freies Östradiol
Abschnitt II: gebundenes Östradiol
Abschnitt III: spezifisch gebundenes Östradiol

und III, zwischen den Fraktionen 24 und 36, enthalten das gebundene Hormon. Sofern das Hormon in Abschnitt II spezifisch gebunden ist, kann nicht ohne weiteres entschieden werden, ob es sich um eine spezifische Bindung an die 4S-Komponente des Receptors oder um eine Bindung an das SHBG handelt. Abschnitt III enthält fast ausschließlich an die 8S-Komponente gebundenes Hormon. Die Zuordnung der Radioaktivität in den einzelnen Abschnitten zu dem Bindungszustand des Hormons erfolgt auf Grund der im Ergebnisteil ausführlich dargestellten Untersuchungsergebnissen.

Bei einigen Versuchen gelang die Abtrennung der Radioaktivität zwischen den Abschnitten II und III nur unvollkommen. In diesen Fällen wurde die abfallende Linie des Radioaktivitätsgipfels in Abschnitt II auf die Nullinie verlängert. Die auf diese Weise extrapolierte Radioaktivität des Abschnittes II wurde an entsprechender Stelle von der Radioaktivität des Abschnittes III abgezogen.

Abb. 3 zeigt eine typische Verteilung der Radioaktivität auf der Bahn nach einer Trennung mit Sephadex G 50 superfine. Während der Abschnitt I der Radioaktivitätsverteilungskurve wie bei der Chromatographie mit G 150 superfine mit der an das freie Hormon fixierten Radioaktivität identisch ist, entspricht die Radioaktivität in Abschnitt II derjenigen von Abschnitt II und III nach Chromatographie auf Sephadex G 150 superfine. Die Abtrennung der Radioaktivitätsmaxima auf G 50 superfine war stets so vollständig, daß eine Extrapolation nicht nötig war.

Die Auswertung der Radioaktivitätsverteilungskurve, wie sie in Abb. 2 dargestellt ist, erfolgte nach dem in Tab. 2 aufgeführten Schema. Bei Auftrennung der Radioaktivität über Sephadex G 150 superfine wurde als freies Hormon die Radioaktivität im Gipfel I und II gewertet. Die "freie" Radioakti-

^{3}H-Östradiol Mol/ltr im Ansatz	6×10^{-8}
aufgetragene Radioaktivität	71492 cpm
wiedergefundene Gesamt-radioaktivität	69936 cpm
„freie" Radioaktivität (Peak I + II)	67790 cpm
gebundene Radioaktivität (Peak III)	2146 cpm
$\frac{\text{„gebunden"}}{\text{gesamt}} \times 100$	3,07 %
Verlust von Radio-aktivität auf der Platte	2,18%

Tab. 2: Auswertung eines Versuches zur Bestimmung der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente des Östradiol-receptors

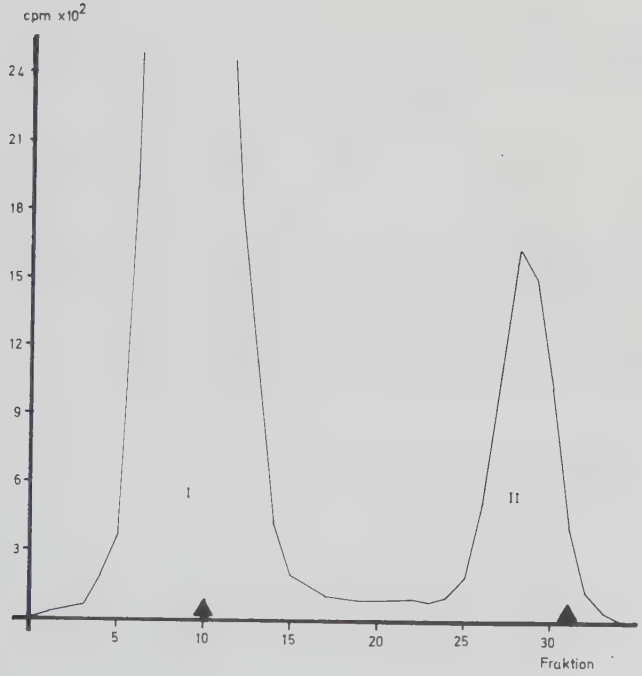


Abb. 3: Trennung von freiem und gebundenem Östradiol durch Gelchromatographie auf Sephadex G 50 superfine.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 70 mit einem Proteingehalt von 15,7 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4^{o}C; 120 min.
Abschnitt I: freies Östradiol
Abschnitt II: gebundenes Östradiol

vität wurde als Differenz zwischen der Gesamtradioaktivität auf der Bahn und der in Abschnitt III erfaßten Radioaktivität, der gebundenen Radioaktivität, ermittelt. Bei Auftrennung der Radioaktivität auf Sephadex G 50 superfine ergab sich die freie Radioaktivität als Differenz der Gesamtradioaktivität auf der Bahn und der in Abschnitt II gemessenen, der gebundenen Radioaktivität. Für jede Bahn wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt: Die Radioaktivität der Meßstreifen wurde summiert und mit der auf den Startpunkt aufgetragenen Radioaktivität verglichen. Die Differenz zwischen diesen beiden Größen betrug im ungünstigsten Fall 18%, meist lag sie jedoch unter 10%. In jedem Fall wurde die gebundene Radioaktivität als Prozent der gemessenen Gesamtradioaktivität ausgedrückt. Die Kenntnis von der spezifischen Radioaktivität des markierten Hormons und die Zählausbeute ermöglichte es, von der Radioaktivität auf die Menge des Hormons umzureichnen.

II. 11. Quantitative Bestimmungen

II. 11. a) Protein im Cytosol

Die Eiweißbestimmung im Cytosol wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt. Als Eichsubstanz diente Rinderalbumin reinst der Fa. Behring. Der Meßbereich der Eichkurve erstreckte sich von 0,05 mg/ml bis 0,7 mg/ml. Die Cytosole wurden in einer Verdünnung von 1:50, 1:100 und 1:150 jeweils mit Dreifachwerten eingesetzt. Die beiden Reaktionen, die zur endgültigen Farbreaktion der Eiweiße führten, nämlich 1. die Reaktion der kupferhaltigen alkalischen Natriumcarbonatlösung mit den Eiweißen und 2. die Reduktion des Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz durch das mit Kupfer behandelte Eiweiß, liefen in einem Wasserbad bei 25°C ab. Als Kontrollen dienten handelsübliche Sera, die in entsprechenden Verdünnungen angewandt wurden. Das Kontrollserum Monitrol I der Fa.

Merz and Dade enthielt bei dieser Bestimmungsmethode im Mittel 7,16 g/100ml (n = 8); dies entspricht 99,16% des Sollwertes. Der Variationskoeffizient betrug hierbei 3,4%. Die Eiweißbestimmung im Kontrollserum Precinorm S ergab im Mittel 5,88 g/100ml (n = 9) und entspricht damit 98,5% des Sollwertes; der Variationskoeffizient betrug hierbei 3,3%. Die Proteinkonzentrationen der Cytosole schwankten zwischen 10,2 und 30,0mg/ml (Mittelwert: 17,3mg/ml; Median: 15,7mg/ml).

II. 11. b) DNA im Sediment

Die DNA-Bestimmung im Sediment wurde in Anlehnung an die Methoden von Burton et al. (1956) und Dische (1930), modifiziert von Liedtke (1972), durchgeführt. 0,5 g Aliquote des Sedimentes der Präparation wurden zweimal mit 3,0 ml Perchlorsäure extrahiert. Zur Ermittlung des DNA-Gehaltes in dem Extraktionsvolumen wurden Aliquote des Extraktes in drei Verdünnungsstufen (1:2, 1:4, 1:8) eingesetzt. Als Eichsubstanz diente Herings-DNA niedermolekular der Fa. Fluka. Der Meßbereich der Eichkurve erstreckte sich von 0,05 mg/ml bis 0,5 mg/ml. Der DNA-Gehalt im Sediment schwankte zwischen 43,8 mg/g und 77,3 mg/g (Mittelwert: 64,2 mg/g; Median 63,5 mg/g).

II. 11. c) K^+ im Cytosol

Der Kaliumgehalt der Cytosole wurde flammenphotometrisch mit dem Elektrolytautomat 5050 der Fa. Eppendorf bestimmt. Die 1:200 verdünnten Cytosole wurden hierbei in einer Propangasflamme zerstäubt. Die Ionenkonzentration ist der Lichtintensität direkt proportional. Die Intensität wurde bei einer Emissionswellenlänge von 769 nm für Kalium bestimmt. (Alkemade, Herrmann Flammenphotometrie, 2. Aufl. Springer-Berlin 1960). Der Variationskoeffizient bei dieser Bestimmungsmethode, ermittelt mit dem Kontrollserum LabTrol der Fa.

Merz and Dade bei einer mittleren Kaliumionenkonzentration von 4,5 mVal/ltr. betrug 2,1%. Der Kaliumgehalt der Cytosole schwankte zwischen 1,8 mVal/ltr und 24,0 mVal/ltr (Mittelwert: 9,8 mVal/ltr; Median: 10,2 mVal/ltr).

III. Ergebnisse

III. 1. Zur Technik der Gelfiltration

III. 1. a) Sephadexarten

Die Auftrennung des Inkubates in freies und gebundenes Hormon wurde über vier Sephadexarten versucht: über G 50, G 75, G 100, G 150 (Abb. 4). Bei der Chromatographie auf Sephadex G 50 superfine stellten sich zwei Radioaktivitätsgipfel dar, die einwandfrei voneinander getrennt waren. Ersterer erwies sich als identisch mit dem freien Hormon. Auf Sephadex G 100 superfine waren im Anschluß an das erste Radioaktivitätsmaximum zwei weitere zu erkennen. Die drei Radioaktivitätsmaxima auf G 100 superfine ließen sich untereinander nicht eindeutig abgrenzen. Auf G 150 superfine setzte sich der in vorderster Front laufende Radioaktivitätsgipfel eindeutig vom mittleren ab. Letzterer verschmolz jedoch mehr oder weniger mit der ungebundenen Radioaktivität.

Es wird im weiteren Verlauf der Studie unter anderem durch kinetische und kompetitive Untersuchungen gezeigt, daß die Radioaktivität im Bereich des dritten Gipfels auf Sephadex G 150 superfine ausschließlich spezifisch gebunden ist. Die Abhängigkeit dieser spezifischen Bindung von der KCl-Konzentration legt den Schluß nahe, daß es sich um die 8S-Komponente des Östradiolreceptors handelt. Der dritte Radioaktivitätsgipfel zeigt eine etwas geringere Laufgeschwindigkeit als das Ferritin, das ein Molekulargewicht von 540 000 hat.

Auf den mittleren Radioaktivitätsgipfel entfällt sowohl spezifische als auch unspezifische Bindung. Daß es sich dabei z.T. um unspezifische Bindung handelt, können wir u.a. aus Kompetitionsstudien mit steigenden Konzentrationen nicht radioaktiv

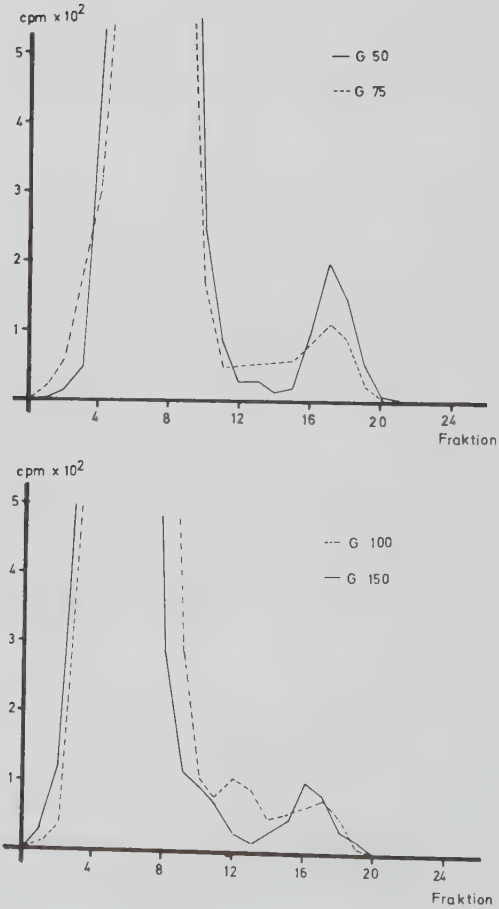


Abb. 4: Trennung von freiem und gebundenem Östradiol durch Gelchromatographie auf vier verschiedenen Sephadexarten, G 50, G 75, G 100, G 150, jeweils superfine.

Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 33 mit einem Proteingehalt von 17,0 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4^{o}C; 120 min. Chromatographiebedingungen: Auftragsvolumen 30 ul; Schichtdicke 0,6 mm; Neigungswinkel 20^{o}; Laufstrecke des Ferritins ca. 10 cm.

markiertem Östradiol (unbeschränkte Bindungskapazität) und aus Studien zur Thermostabilität der bindenden Proteine (keine Thermolabilität eines Teils der Proteine) im Vergleich zur 8S-Komponente des Östradiolreceptors schließen. Als hormonbindende Eiweiße im Radioaktivitätsbereich II sind somit die 4S-Komponente des Östradiolreceptors, das sex-hormon-binding-globulin (SHBG) und andere bindende Eiweiße zu diskutieren.

III. 1. b) Laufstrecke

Wie aus Abb. 5 hervorgeht, trennten sich auf G 150 superfine bei einer Laufstrecke des Ferritins von 17 cm die Radioaktivitätsgipfel II und III (siehe Abb. 2) eindeutig voneinander ab. Zusätzlich deutete sich noch eine Abtrennung der Radioaktivitätsfipgel I und II an. Beide Phänomene waren bei einer Laufstrecke des Ferritins von 8 cm auf G 150 superfine nicht nachweisbar. Die Sephadexgelchromatographie auf G 150 superfine wurde bei den nachfolgenden Versuchen so lange durchgeführt, bis das Ferritin eine Laufstrecke von ca. 17 cm zurückgelegt hatte.

III. 1. c) Neigungswinkel

Die Auftrennung der Radioaktivität auf Sephadex G 150 superfine dauerte zwischen sechs und sieben Stunden, wenn der Neigungswinkel der Dünnschichtgelchromatographie-Platte 10^{o} zur Horizontalen betrug und das Ferritin eine Laufstrecke von 17 cm zurücklegen sollte. Der Trennungsvorgang läßt sich beschleunigen, wenn der Neigungswinkel vergrößert wird. Erst ab einem Neigungswinkel zur Horizontalen, der größer als 25^{o} war, stellte sich eine Verschlechterung der Trennschärfe ein. Es wurde üblicherweise bei einem Neigungswinkel von 20^{o} zur Horizontalen gearbeitet. Dabei dauerte die Chromatographie

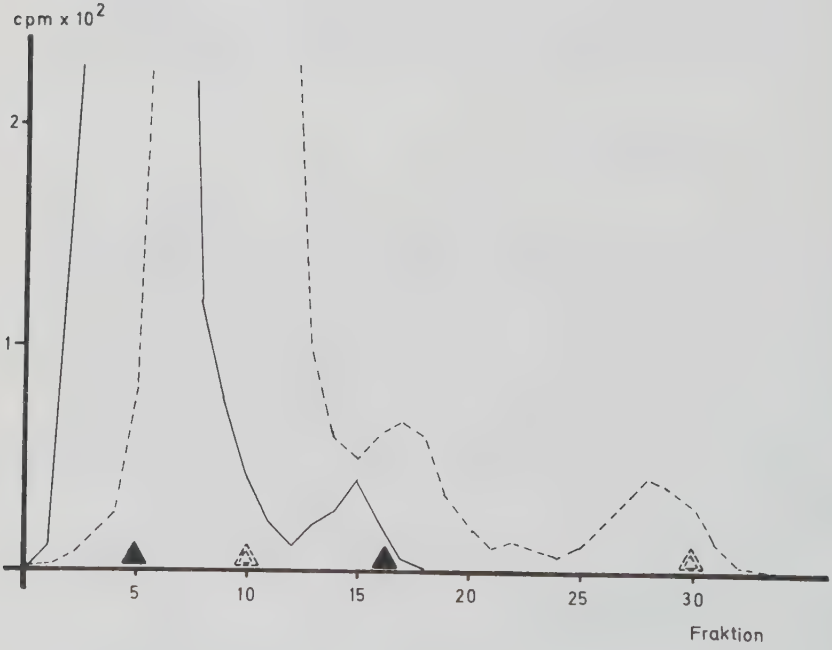


Abb. 5: Trennung von freiem und gebundenem Östradiol durch Gelchromatographie auf Sephadex G 150 superfine in Abhängigkeit von der Laufstrecke.

Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 32 mit einem Proteingehalt von 17,0 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4^oC; 120 min.

Chromatographiebedingungen: Auftragvolumen 30 ul; Schichtdicke 0,6mm; Neigungswinkel 20^o; Laufstrecke des Ferritins a) 8,5 cm, b) 15 cm.

auf G 150 superfine für eine Ferritinlaufstrecke von 17 cm zwischen drei und vier Stunden.

III. 1. d) Auftragsvolumina

Bis zu 30 µl des Inkubates konnten zur Gelchromatographie am Startpunkt einer Bahn aufgetragen werden, ohne daß eine Einbuße der Trennschärfe zu beobachten gewesen war. Bei einem Auftragsvolumen von 50 µl kam es zu einer so mangelhaften Trennung der Radioaktivitätsgipfel, daß die Radioaktivität des dritten Gipfels trotz Korrektur (siehe II.10.) überproportional erhöht war (Abb. 6).

III. 2. Charakterisierung der 8S-Komponente des Östradiolreceptors

III. 2. a) Einluß der Inkubationstemperatur

Zur Überprüfung des Einflusses der Inkubationstemperatur auf die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors wurde Cytosol mit ^{3}H-Östradiol (6×10^{-8} molar im Ansatz) über 60 Minuten bei 4°C, 24°C und 37°C inkubiert. Die Bindung von ^{3}H-Östradiol an den Receptor war bei 4°C maximal. Bei einer Inkubationstemperatur von 24°C bzw. 37°C war die Bindung um 78% bzw. 72% reduziert (Abb. 7). Der Einfluß der Inkubationstemperatur auf die ^{3}H-Östradiolbindung an die Proteine im Radioaktivitätsgipfel II war entgegengesetzt: Die Bindung an diese Eiweiße nahm mit steigender Inkubationstemperatur zu (Abb. 8). Die Inkubation wurde üblicherweise bei 4°C durchgeführt.

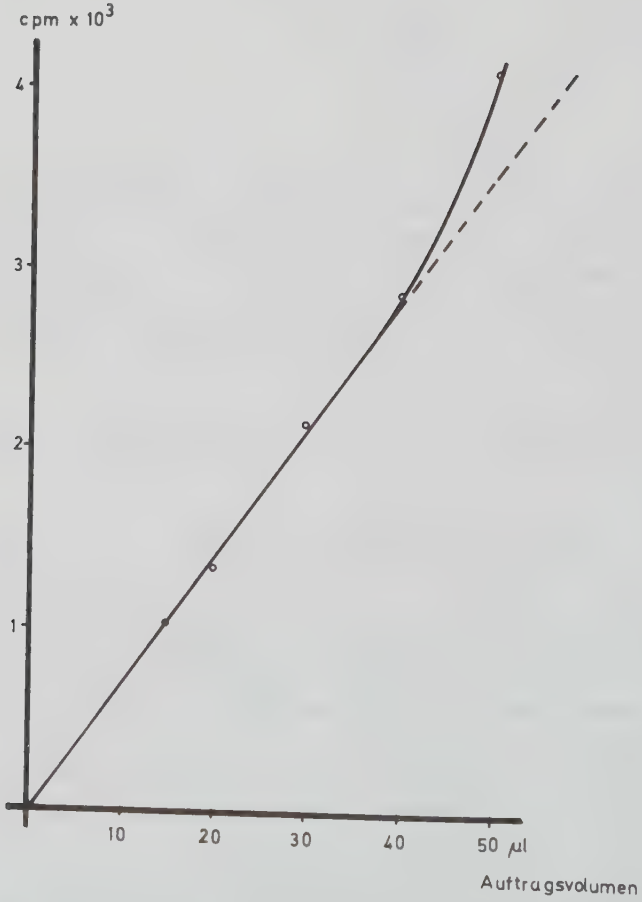


Abb. 6: Trennung von freiem und gebundenem Östradiol durch Gelchromatographie auf G 150 superfine bei verschiedenen Auftragsvolumina. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 65 mit einem Proteingehalt von 19,3 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 120 min.
Chromatographiebedingungen: Schichtdicke 0,6 mm; Neigungswinkel 20^o; Laufstrecke des Ferritins 15 cm.

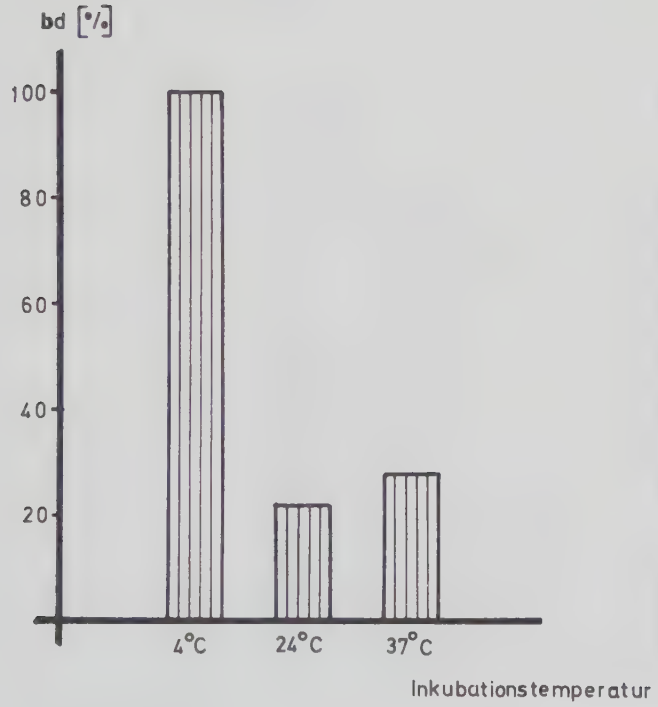


Abb. 7: Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors. Angaben in Prozent der Bindung bei $4^{o}C$.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 75 mit einem Proteingehalt von 18,7 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6×10^{-8} molar; 60 min.

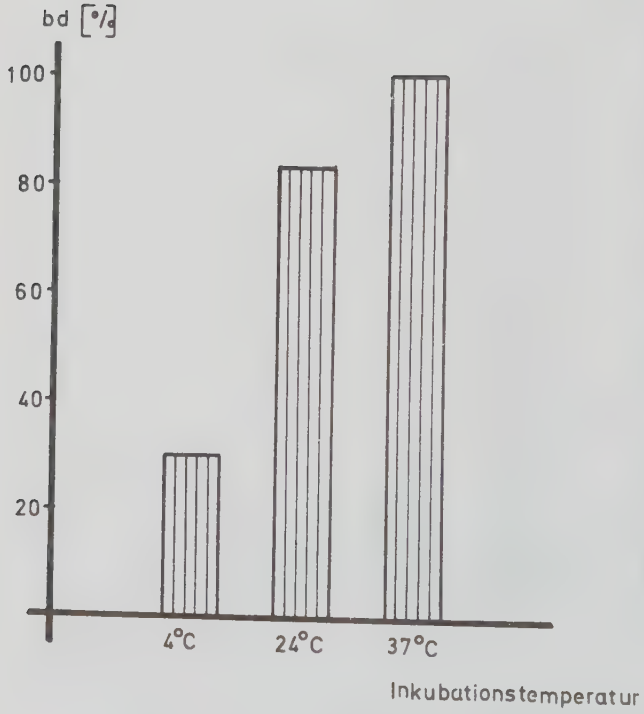


Abb. 8: Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Bindung von Östradiol an die Proteine im Radioaktivitätsgipfel II. Angaben in Prozent der Bindung bei 37°C.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 75 mit einem Proteingehalt von 18,7 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 60 min.

III. 2. b) Einfluß der Dauer der Inkubation

Der Einfluß der Inkubationsdauer auf die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors wurde jeweils für die Inkubationstemperaturen von 4°C, 24°C und 37°C geprüft. Bei einer Inkubationstemperatur von 4°C stellte sich das Maximum der spezifischen Bindung nach 90 Minuten ein (Abb. 9). Es zeigte sich, daß der Gleichgewichtszustand der Bindung an den Receptor, wie er sich nach 90 Minuten eingestellt hatte, bis zu einer Inkubationsdauer von 24 Stunden erhalten blieb (Abb.10). Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C stellte sich das Maximum der Bindung bereits nach 10 Minuten ein. Anschließend kam es rasch zu einem Abfall der Bindung, so daß nach einer Stunde nur noch 59% der Maximalbindung bei 10 Minuten vorlag (Abb. 9). Die Bindung an den Receptor verhielt sich bei 24°C nicht wesentlich anders als bei 37°C. Vergleicht man die maximale Bindung bei den verschiedenen Temperaturen, so imponiert wiederum die hohe spezifische Bindung bei 4°C, die um das 2,2-fache höher lag als die bei 37°C (Abb. 9). Im Gegensatz zum Maximum der Bindung an die 8S-Komponente des Receptors stellte sich das Maximum der Bindung an die Proteine im Bereich des Radioaktivitätsgipfels II in allen Temperaturbereichen nach ca.90 Minuten ein und blieb während 24 Stunden erhalten. Die maximale Bindung bei 4°C betrug nur 30% von derjenigen bei 37°C (Abb. 11). Wir inkubierten, sofern die Fragestellung nichts anderes erforderte, bei 4°C über 120 Minuten.

III. 2. c) Einfluß des pH-Wertes

Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration im Inkubat auf die Eiweißbindung wurde innerhalb eines pH-Bereiches von 6,1 bis 9,5 untersucht. Die Einstellung des pH-Wertes im Cytosol erfolgte vor Zugabe der Steroidlösung durch Zugabe von HCl oder NaOH. Der Eiweißgehalt im Ansatz wurde in jedem Fall

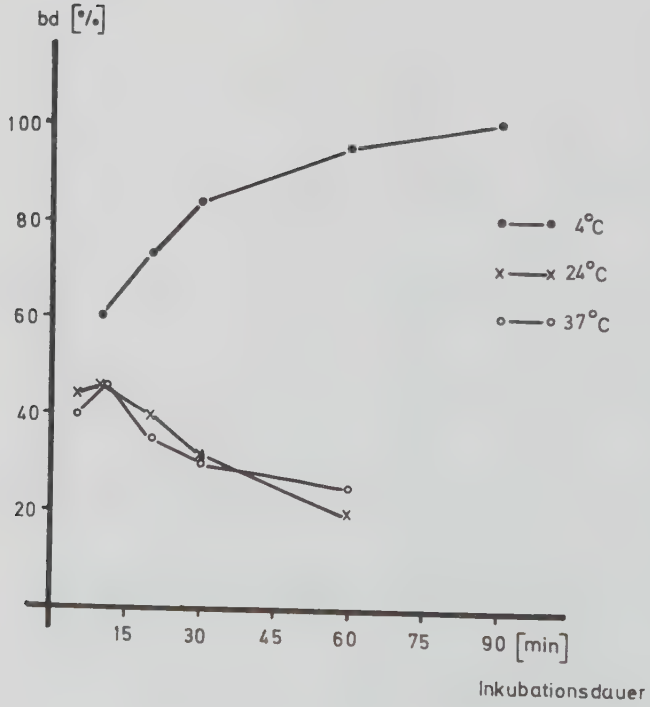


Abb. 9: Einfluß der Inkubationsdauer bei verschiedenen Temperaturen auf die Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors. Angaben in Prozent der Bindung bei $4^{o}C$ und 90 min. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 83 mit einem Proteingehalt von 18,5 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6×10^{-8} molar.

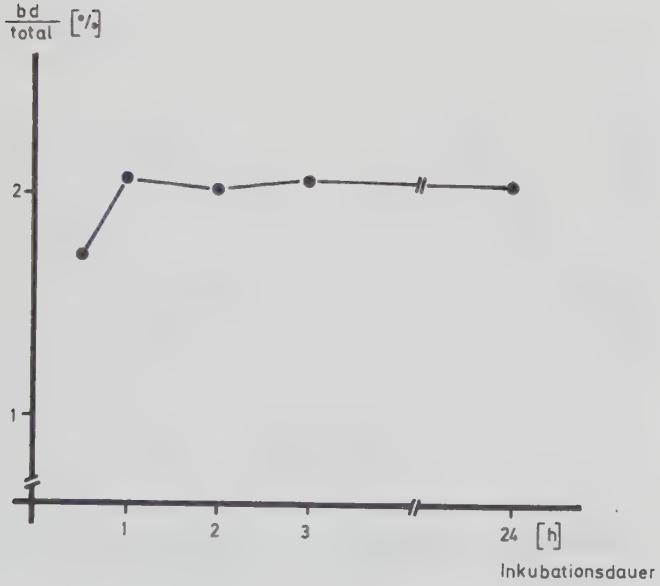


Abb. 10: Das Verhalten der Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors über eine Inkubationsdauer von 24 std. Angaben der spezifischen Bindung in Prozent der Gesamtradioaktivität. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 65 mit einem Proteingehalt von 19,3 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4^{o}C.

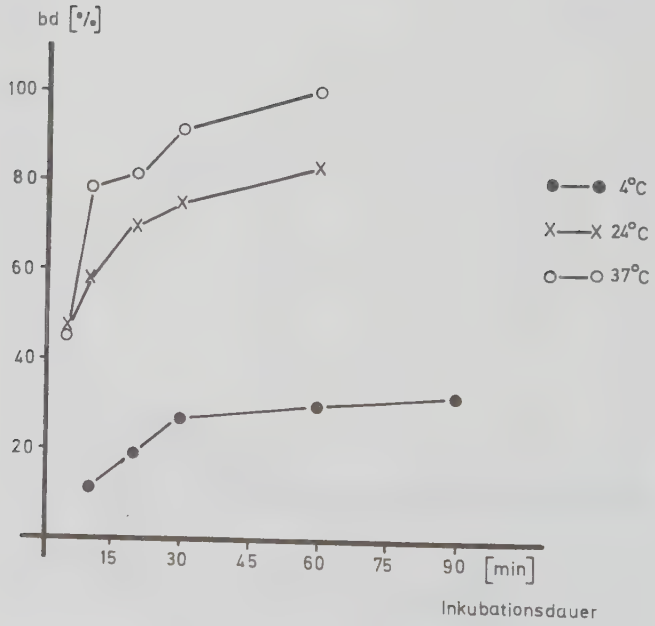


Abb. 11: Einfluß der Inkubationsdauer bei verschiedenen Temperaturen auf die Bindung von Östradiol an die Proteine im Radioaktivitätsgipfel II. Angaben in Prozent der Bindung bei 37°C und 60 min. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 83 mit einem Proteingehalt von 18,5 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar.

konstant gehalten. Das Maximum der Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors wurde bei einem pH-Wert von 6,9 gemessen (Abb. 12). Das Maximum der Bindung an die Proteine im Radioaktivitätsgipfel II stellte sich bei einem pH-Wert von 8,0 ein (Abb. 13).

III. 2. d) Hitzelabilität des Receptors

Die Temperaturempfindlichkeit der 8S-Komponente des Receptors wurde durch Vorinkubation des Cytosols bei $4^{o}C$, $20^{o}C$, $30^{o}C$ und $40^{o}C$ über 60 Minuten geprüft. An die Vorinkubation schloß sich die übliche Inkubation mit ^{3}H-Östradiol bei $4^{o}C$ an. Die starke Hitzelabilität des Receptors geht daraus hervor, daß eine einstündige Vorinkubation bei $20^{o}C$ zu einer Reduktion der Bindung um 71%, bei $30^{o}C$ um 90% und bei $40^{o}C$ um 94% gegenüber der bei $4^{o}C$ führte (Abb. 14). Deshalb wurde das Cytosol vor der Inkubation nur bei $4^{o}C$ gehandhabt.

III. 2. e) Haltbarkeit des Receptors bei $-20^{o}C$

Die Haltbarkeit der 8S-Komponente des Östradiolreceptors bei $-20^{o}C$ wurde über eine Lagerungsdauer von bis zu zehn Tagen geprüft. Dabei zeigte sich in keinem der neun untersuchten Fälle eine Beeinträchtigung der spezifischen Bindung (Abb. 15). Da nicht geprüft wurde, zu welchem Zeitpunkt ein Abfall der spezifischen Bindung einsetzte, wurde bei der Untersuchung biologischer Fragestellungen kein Cytosol länger als zehn Tage tiefgefroren aufbewahrt, bevor der Receptorgehalt bestimmt wurde.

III. 2. f) Einfluß von Glycerol

Für den Fall, daß Glycerol als Lösungsvermittler von Steroiden in das Inkubationsmedium eingeht, interessiert die Frage,ob Glycerol einen Einfluß auf die Bindung von ^{3}H-Östradiol an die

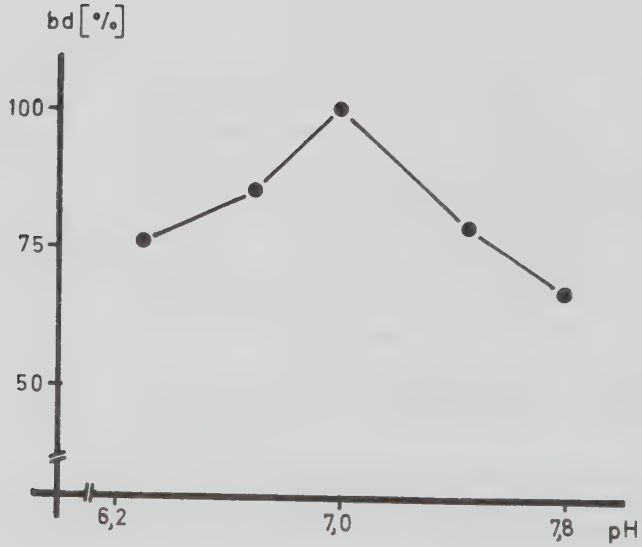


Abb. 12: Einfluß des pH-Wertes im Inkubationsmedium auf die Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors. Angaben in Prozent der Bindung bei pH 7,0.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 69 mit einem Proteingehalt von 14,0 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4^{o}C; 120 min.

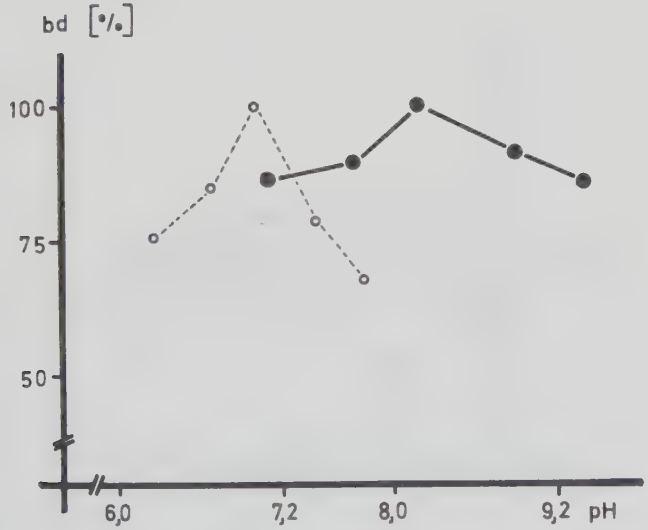


Abb. 13: Einfluß des pH-Wertes im Inkubationsmedium auf die Bindung von Östradiol an die Proteine im Radioaktivitätsgipfel II (●—●) im Vergleich zur Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors (o---o). Angaben in Prozent der Bindung an die Proteine im Radioaktivitätsgipfel II bei pH 8,2. Angabe der Bindung an die 8S-Komponente des Receptors in Prozent der Bindung bei pH 7,0. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 108 mit einem Proteingehalt von 18,0 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4^{o}C; 120 min.

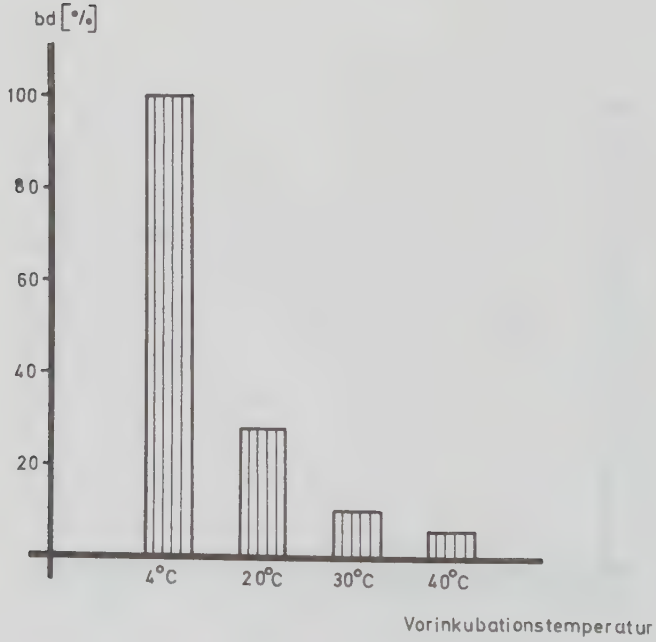


Abb. 14: Temperaturempfindlichkeit der 8S-Komponente des Östradiolrezeptors. Das Cytosol wurde vor der Inkubation mit ^{3}H-Östradiol über 60 min. Temperaturen von 4°C, 20°C, 30°C und 40°C ausgesetzt. Angaben in Prozent der spezifischen Bindung nach Vorinkubation über 60 min. bei 4°C.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 75 mit einem Proteingehalt von 18,7 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4°C; 120 min.

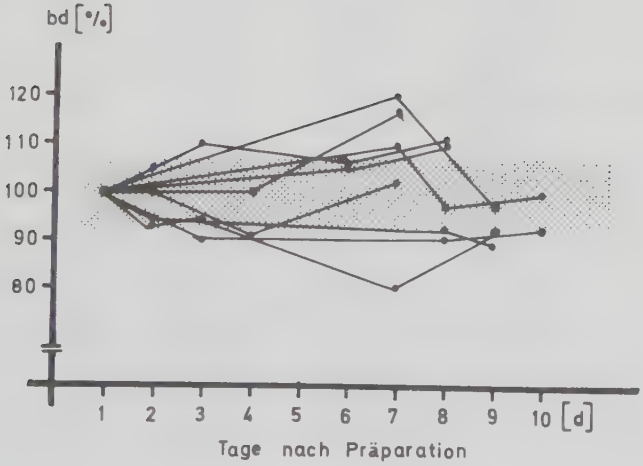


Abb. 15: Das Verhalten der Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors nach unterschiedlich langer Lagerung bei - 20°C. Untersuchungen anhand von 9 Cytosolen (26 Verlaufsmeßpunkte). Die Grauzone verdeutlicht die Streubreite der Methodik, erfaßt durch den Variationskoeffizienten von Platte zu Platte (VK = 7,2 %; n = 7).

8S-Komponente des Östradiolreceptors hat. Cytosol wurde mit ^{3}H-Östradiol in Gegenwart unterschiedlicher Glycerolkonzentrationen inkubiert. Dabei zeigte sich, daß die Bindung an die 8S-Komponente des Receptors selbst bei einer 10%igen Konzentration des Glycerols im Inkubat nicht beeinflußt wurde (Abb. 16). Der Zusatz von Glycerol zum Puffer, der zur Aufarbeitung des Cytosols benutzt wurde, führte nicht zu einer Steigerung der Ausbeute an spezifisch bindenden Proteinen. Deshalb erfolgte die Präparation des Cytosols ohne Zusatz von Glycerol.

III. 2. g) Einfluß von Äthanol

Da die wässrigen Lösung der Steroide äthanolhaltig waren, war der Einfluß von Äthanol auf die Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors abzuklären. Cytosol wurde mit ^{3}H-Östradiol in Gegenwart unterschiedlicher Äthanolkonzentrationen inkubiert. Hierbei zeigte sich, daß die spezifische Bindung des ^{3}H-Östradiol zumindestens bis zu einer Konzentration von 10% Äthanol im Inkubat nicht negativ beeinflußt wurde (Abb. 17). Der Äthanolgehalt des Inkubationsmediums betrug nie mehr als 0,5%, sieht man von dem Äthanolgehalt von 10% bei der Inkubation mit Nafoxidine ab.

III. 2. h) Einfluß von Dithioerythrit

Auf Grund der Empfehlung von Ratajczak und Hähnel (1974) erfolgte die Aufarbeitung des Gewebes mit Puffer, der Dithioerythrit in einer Konzentration von 0,001 molar enthielt. Es wurde untersucht, ob eine Steigerung der Dithioerythritkonzentration im Inkubationsmedium eine Wirkung auf die Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors besaß. Hierbei zeigte sich, daß eine Erhöhung der Dithioerythritkonzentration bis auf 0,02 molar im Inkubationsmedium keinen

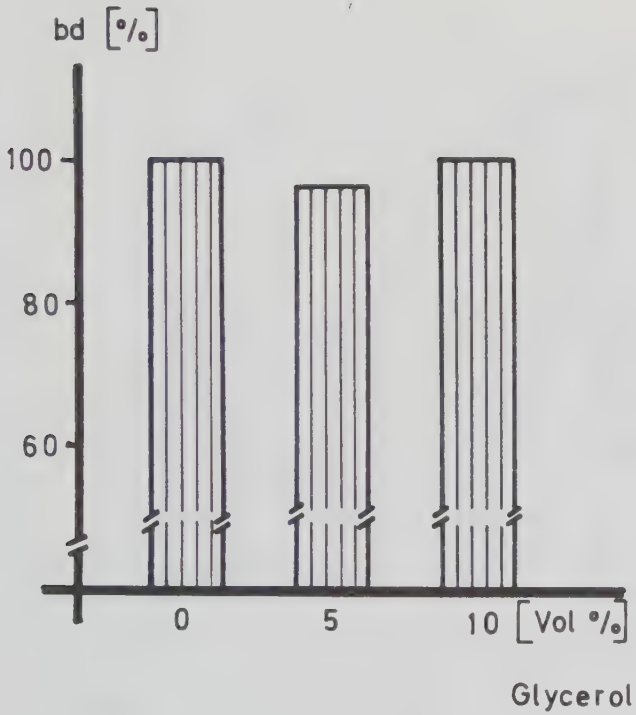


Abb. 16: Einfluß der Glycerolkonzentration im Inkubationsmedium auf die Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors.
Angaben der spezifisch gebundenen Radioaktivität (bd) in Prozent der Kontrolle.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 107 mit einem Proteingehalt von 23,5 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4°C; 120 min.

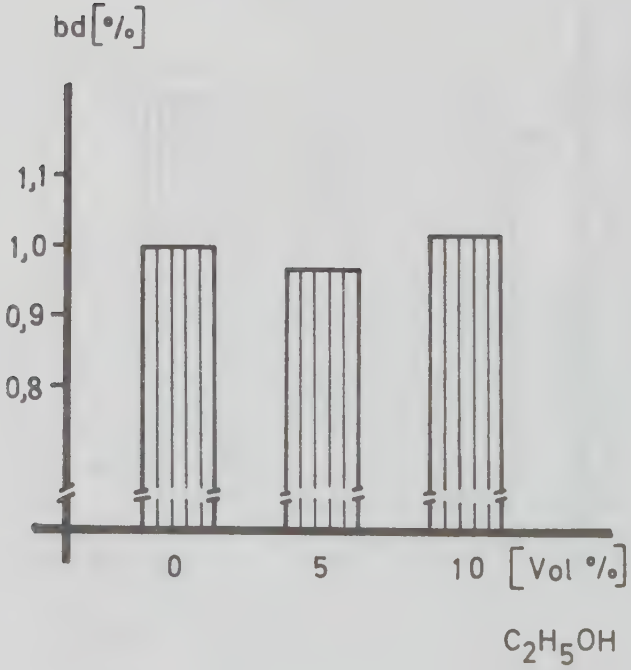


Abb. 17: Einfluß der Äthanolkonzentration im Inkubationsmedium auf die Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors.
Angaben der an die 8S-Komponente gebundenen Radioaktivität (bd) als Prozent der Gesamtradioaktivität.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr.83 mit einem Proteingehalt von 15,8 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4^{o}C; 120 min.

Einfluß auf die ^{3}H-Östradiolbindung an die 8S-Komponente des Receptors hatte (Abb. 18).

III. 2. i) Einfluß von KCl

Da bekannt ist, daß die KCl-Konzentration einen Einfluß auf den Aggregationszustand des Receptors hat, untersuchten wir die Frage, ob eine Steigerung der KCl-Konzentration im Inkubationsmedium über die endogene Konzentration hinaus die Bindung im Radioaktivitätsgipfel III kurz vor Ferritin auf G 150 superfine beeinflußt. Die K^+-Konzentration des Cytosols betrug im Durchschnitt 9,83 mVal/ltr, minimal 1,80 mVal/ltr, maximal 24,0 mVal/ltr.Eine Verminderung der 8S-Komponente des Receptors war bereits deutlich nachweisbar, wenn die K^+-Konzentration des Cytosols um 0,1 Val/ltr angehoben wurde. Wurde die K^+-Konzentration des Cytosols um das ca. 10-fache der maximalen endogenen K^+-Konzentration, also um 0,25 Val/ltr angehoben, so verminderte sich die 8S-Komponente des Receptors um 56%. Sie war um 80% reduziert, wenn die KCl-Konzentration um 0,3 Mol/ltr angehoben wurde (Abb. 19). Veränderungen der K^+-Konzentration im Bereich der "physiologischen" K^+-Konzentration des Cytosols, d.h. Anhebungen um bis zu 20 mVal/ltr, beeinflußten die 8S-Komponente des Receptors nur unwesentlich (Abb. 20). Während in Gegenwart hoher KCl-Konzentrationen die Bindung im Radioaktivitätsgipfel III abnahm, nahm sie im Bereich des Radioaktivitätsgipfels II zu.

III. 3. Kinetik der Östradiolbindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors

III. 3. a) Einfluß der Bindung im Radioaktivitätsgipfel II

Wie in III. 1. a) angedeutet, läßt sich das Hormon im Radioaktivitätsgipfel II nicht nur auf eine Bindung an das Receptorprotein zurückführen. Orientierende Untersuchungen mit

Abb. 18: Einfluß der Dithioerythritkonzentration im Inkubationsmedium auf die Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors. Angabe der spezifisch gebundenen Radioaktivität (bd) als Prozent der Gesamtradioaktivität.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 108 mit einem Proteingehalt von 18,0 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4°C, 120 min.

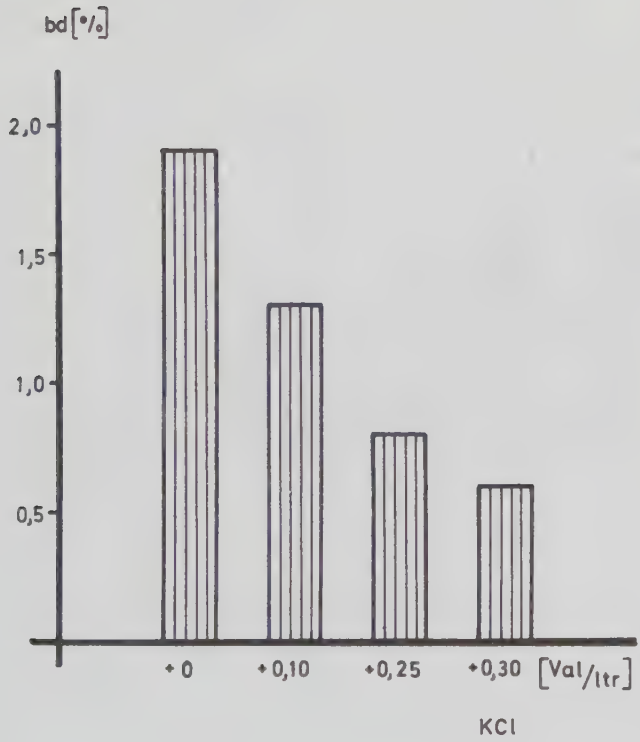


Abb. 19: Einfluß der Erhöhung der K^+-Konzentration um das Vielfache der cytosoleigenen K^+-Konzentration auf die Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors. Angaben der spezifisch gebundenen Radioaktivität (bd) in Prozent der Gesamtradioaktivität. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 67 mit einem Proteingehalt von 26,3 mg/ml und einer K^+-Konzentration von 0,024 val/ltr; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4^oC; 120 min.

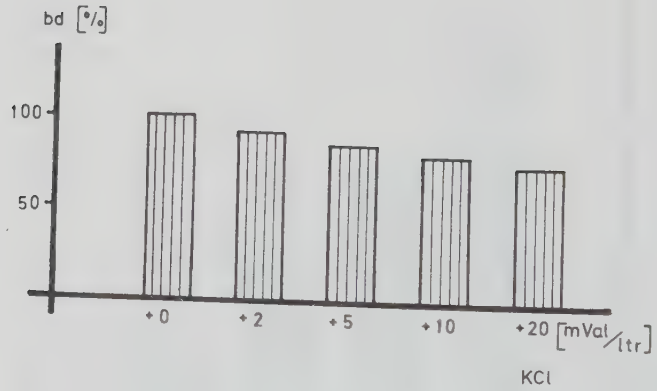


Abb. 20: Einfluß der Erhöhung der K^+-Konzentration im Bereich der Streubreite der cytosoleigenen K^+-Konzentration auf die Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors. Angaben in Prozent der spezifisch gebundenen Radioaktivität (bd) bei Zugabe von 10 µl K^+-freiem Puffer zu 80 µl Cytosol und 10 µl ^{3}H-Östradiollösung.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 100 mit einem Proteingehalt von 16,0 mg/ml und einer K^+-Konzentration von 0,017 val/ltr; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8}molar; 4°C; 120 min.

Serum hatten z.B. ergeben, daß an Serumproteine gebundene ^{3}H-Östradiol bei der Auftrennung auf G 150 suferine mit dem Radioaktivitätsgipfel II des Cytosols zusammenfällt. Da der prozentuale Anteil der Radioaktivität im Gipfel II an der Gesamtradioaktivität nicht nur von der Präparation, sondern auch von der ^{3}H-Östradiolkonzentration abhing und nicht selten 20 - 30% ausmachte, untersuchten wir die Frage, inwieweit die Bindung des Östradiol an die Proteine im Radiaktivitätsgipfel II einen Einfluß auf die Bindung des ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors ausübt. Der Radioaktivitätsgipfel III eines Cytosols, das mit Serum verschnitten war, wurde mit demjenigen des Cytosols verglichen, das eine entsprechende Menge Puffer enthielt. Wie aus Abb. 21 hervorgeht, veränderte sich der Radioaktivitätsgipfel III des Cytosols durch Zusatz von Serum nicht, obwohl der Radioaktivitätsgipfel II durch die Beimengung von Serum so anstieg, daß er sich nicht mehr von dem Radioaktivitätsgipfel I abtrennen ließ. Hieraus folgt, daß die Menge Östradiol, die an die vorhandene 8S-Komponente des Receptors gebunden wird, lediglich von der Gesamtkonzentration des Steroids abhängt. Dabei spielt es offensichtlich keine Rolle, wieviel Prozent des nicht receptorgebundenen Steroids in ungebundener bzw. nicht an Receptorproteine gebundener Form vorliegt. Die Auswertung der Versuche erfolgte daher in dem Sinne, daß der Radioaktivitätsgipfel I und II zusammen als freies Steroid gewertet wurden.

III. 3. b) Affinität der spezifischen Bindung

Die Affinität der Bindung zwischen Östradiol und der 8S-Komponente des Receptors wurde aus der Konzentrationsbindungskurve nach Umwandlung in einen Scatchard-Plot in Form der Assoziationskonstanten K_{ass} ermittelt. In Abb. 22 sind zwei Fälle exemplarisch dargestellt. In jedem Fall ergab die Umwandlung der Konzentrationsbindungskurve nach Scatchard eine Gerade. Nach diesen kinetischen Studien ist von nur einer einzigen

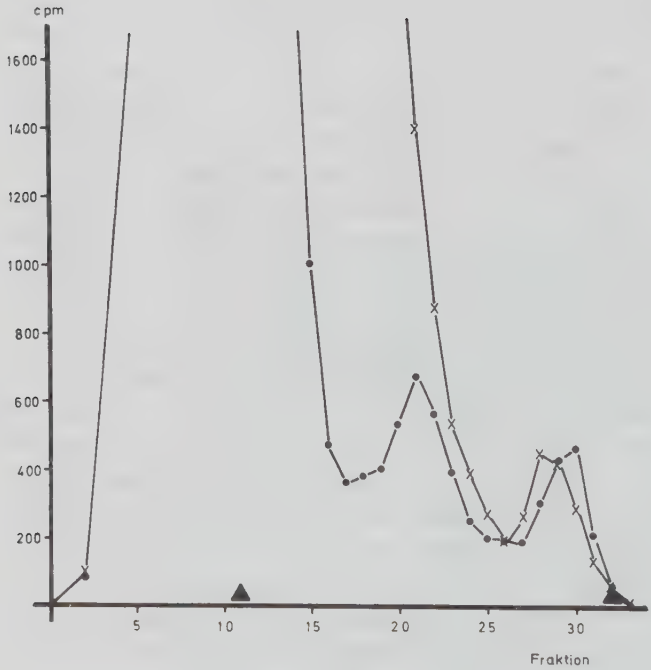
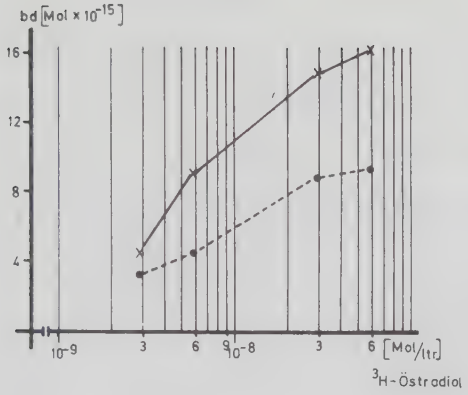


Abb. 21: Einfluß der Bindung an nicht-Receptorproteine im Radioaktivitätsgipfel II auf die Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors. 80 µl Cytosol wurden mit 10 µl Serum (X——X) bzw. mit 10 µl Puffer (●—●) inkubiert und anschließend über G 150 superfine aufgetrennt.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 109 mit einem Proteingehalt von 19,0 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4^{o}C; 120 min.



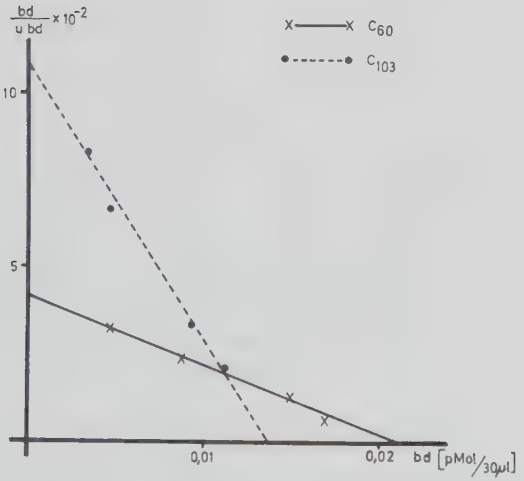


Abb. 22: Bindung von Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors in zwei Cytosolen.
a) Konzentrationsbindungskurve, b) Scatchard-Diagramm.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 103 mit einem Proteingehalt von 17,0 mg/ml bzw. Cytosol Nr. 60 mit einem Proteingehalt von 15,0 mg/ml; 4°C; 120 min. (bd = gebunden; u. bd = nicht gebunden).

Receptorklasse auszugehen. Die Konzentrationsbindungskurven wurden von insgesamt elf Cytosolen hergestellt. Der Schwankungsbereich der K_{ass} lag zwischen 0,49 x 10^8 ltr/Mol und 5,0 x 10^8 ltr/Mol. Der Median betrug 1,35 x 10^8 ltr/Mol (Tabelle 3).

III. 3. c) Kapazität der spezifischen Bindung

Die Kapazität der Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors wurde ebenfalls aus dem Scatchard-Diagramm errechnet. Sie wurde unter Berücksichtigung des Proteingehaltes im Ansatz bzw. des DNA-Gehaltes des Sedimentes, aus dem sich die Menge Cytosol im Ansatz ableitete, auf jeweils ein Milligramm DNA umgerechnet. Bei den elf untersuchten Cytosolen schwankte die Kapazität der Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors,bezogen auf 1 mg Protein, zwischen 2,4 x 10^{-14} Mol/mg und 16,2 x 10^{-14} Mol/mg. Der Median lag bei 5,5 x 10^{-14} Mol/mg (Tabelle 3). Die sieben Cytosole, von denen eine DNA-Bestimmung im Sediment durchgeführt worden war, zeigten eine Kapazität der spezifischen Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors, bezogen auf 1 mg DNA, zwischen 5,1 x 10^{-14} Mol/mg und 21,5 x 10^{-14} Mol/mg (Tabelle 3). Eine Beziehung zwischen der Bindungskapazität bezogen auf den DNA-Gehalt des Sedimentes und der Bindungskapazität bezogen auf den Proteingehalt des Cytosols war deutlich zu erkennen (Abb.23).

III. 4. Kompetition an der 8S-Komponente des Östradiolreceptors

III. 4. a)Mit Östrogenen

Die Affinität verschiedener Östrogene zur 8S-Komponente des Östradiolreceptors wurde durch Kompetitionsstudien untersucht. Zur Verdrängung des ^{3}H-Östradiol (9 x 10^{-9} Mol/ltr) wurden Konzentrationen der Substanzen zwischen 6 x 10^{-9} Mol/ltr und

n	Cytosol	$K_{ass} \times 10^{8}$ l/Mol	Bindungsstellen x 10^{-14} Mol/mg Prot	Mol/mg DNA
1	60	0,52	5,5	/
2	62	0,95	4,9	/
3	69	3,36	9,5	/
4	70	5,00	16,2	/
5	101	0,75	7,3	31,1
6	103	2,42	2,4	5,7
7	105	0,49	10,7	36,1
8	108	1,20	4,3	21,5
9	109	4,14	3,7	15,4
10	111	2,58	4,4	12,9
11	112	1,35	10,9	31,4
Maximum:		5,00	16,2	36,1
Minimum:		0,49	2,4	5,7
Median :		1,35	5,5	21,5

Tab. 3: Affinität und Kapazität der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors im Cytosol des Myometriums von elf verschiedenen Uteri unter Berücksichtigung des Protein-bzw. DNA-Gehaltes.

6×10^{-6} Mol/ltr im Inkubationsmedium gewählt. Unter den endogenen Östrogenen zeigte das Östriol dieselbe Affinität zum 8S-Receptor wie das Östradiol, während Östron eine etwas geringere Affinität aufwies (Abb. 24).

Unter den synthetischen Östrogenen waren große Unterschiede zu erkennen. Äthinylöstradiol wirkte etwas stärker verdrängend als Östradiol (Abb. 25). Mestranol, der Methylester des Äthinylöstradiol, das in vivo zum Teil in Äthinylöstradiol umgewandelt wird, wirkte deutlich schwächer verdrängend als Athinylöstradiol (Abb. 26) und als Östradiol (Abb. 27). Diäthylstilböstol wirkte ähnlich stark verdrängend wie Östradiol (Abb. 27). Nafoxidine, eine biologisch hochwirksames Antiöstrogen, wirkte etwas schwächer verdrängend als Östradiol (Abb. 28).

Bei der Inkubation des ^{3}H-Östradiols mit dem Cytosol in Gegenwart von Östradiolestern wie Östradiolvalerianat, Östradiolönanthat und Östradiolbenzoat ließ sich durchaus ein verdrängender Effekt der Östradiolester nachweisen, der jedoch sehr viel schwächer war als der von Östradiol (Abb. 29). In diesen Ansätzen wurde allerdings nicht zugleich untersucht, inwieweit die Steroidester am Ende der Inkubation durch eventuell im Cytosol vorhandene Esterasen gespalten worden waren. Für den Fall, daß eine Esterspaltung tatsächlich stattfindet, wären diese Ergebnisse u.U. nicht als Effekt der Ester, sondern des freigesetzten Östradiol selbst zu deuten.

III. 4. b) Mit Gestagenen

Zur Oberprüfung des Einflusses von Gestagenen auf die Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors standen neben dem Progesteron folgende synthetische Gestagene zur Verfügung: Cyproteron, Norethisteron und Norgestrel. Zugleich wurden auch die Acetate der zuletzt genannten Gestage-

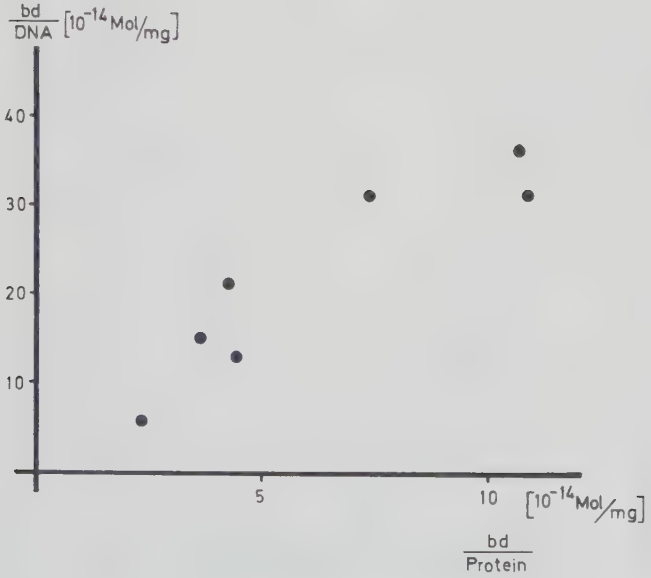


Abb. 23: Beziehung zwischen der Kapazität der 8S-Komponente des Receptors bezogen auf den DNA- bzw. Proteingehalt des Cytosols (bd = gebunden).

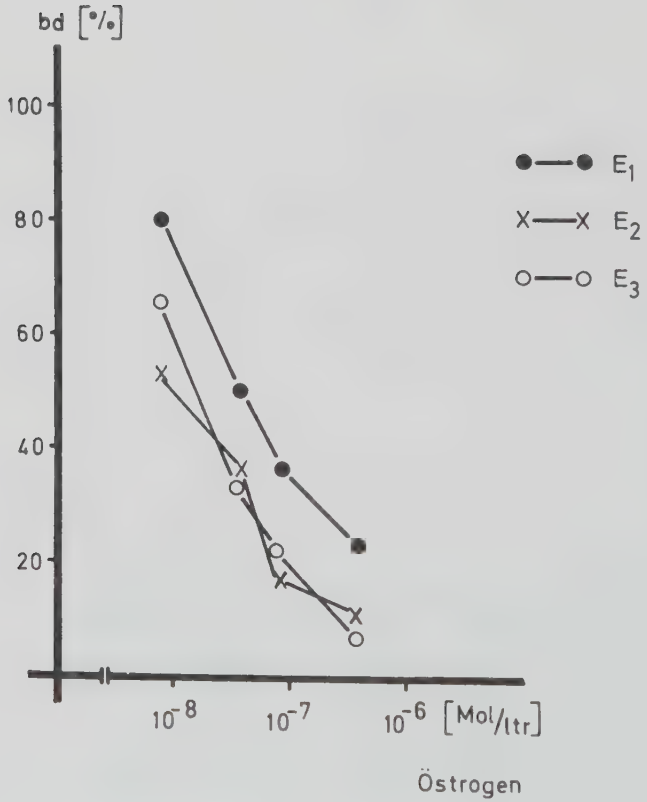


Abb. 24: Kompetition von Östron, Östradiol und Östriol mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Angaben in Prozent der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente ohne Zugabe einer verdrängenden Substanz. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 108 mit einem Proteingehalt von 18,0 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 9 x 10^{-9} molar; 4°C; 120 min.

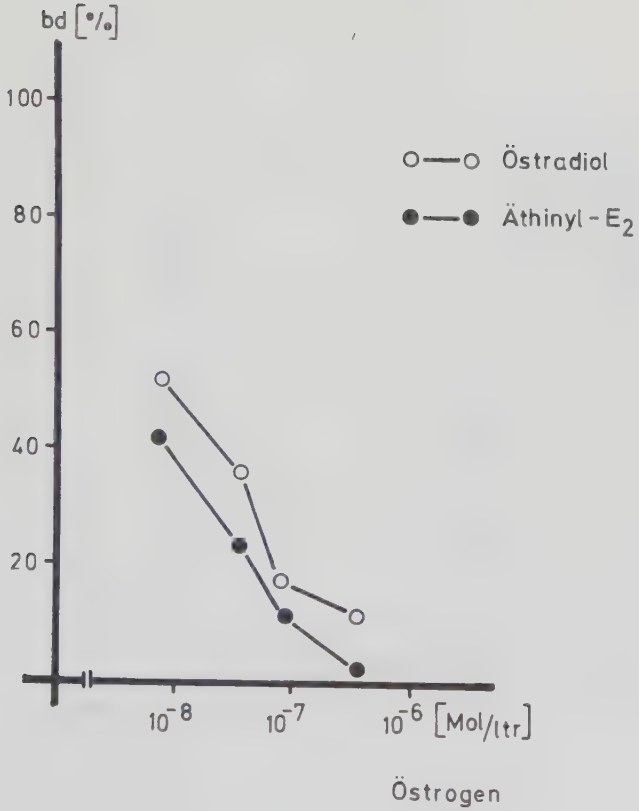


Abb. 25: Kompetition von Äthinylöstradiol und Östradiol mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Angaben in Prozent der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente ohne Zugabe einer verdrängenden Substanz. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 108 mit einem Proteingehalt von 18,0 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 9 x 10^{-9} molar; 4°C; 120 min.

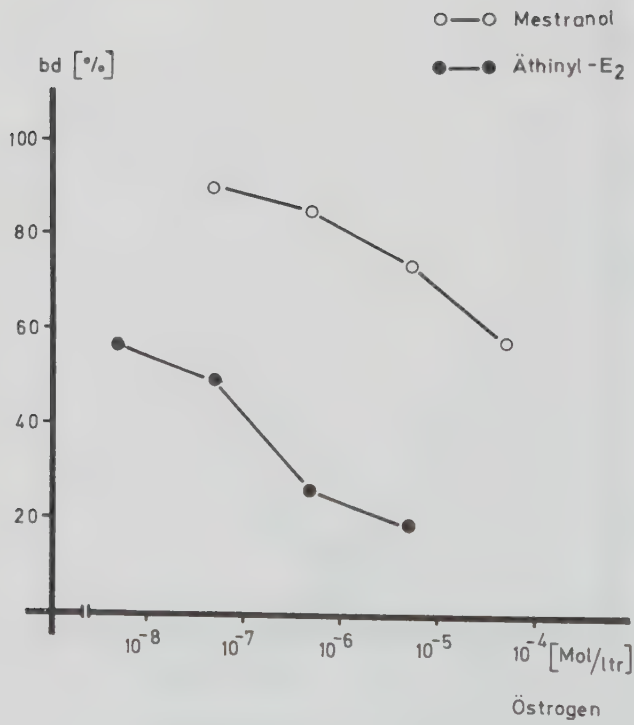


Abb. 26: Kompetition von Mestranol und Äthinylöstradiol mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an der 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Angaben in Prozent der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente ohne Zugabe einer verdrängenden Substanz. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 112 mit einem Proteingehalt von 15,8 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4^{o}C; 120 min.

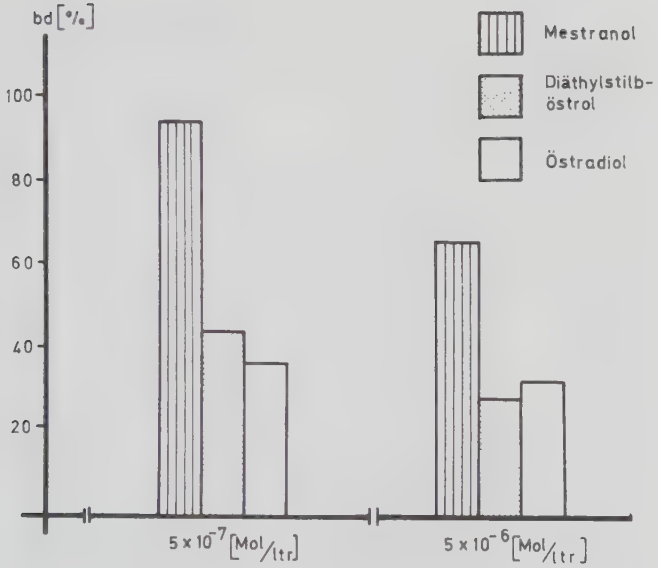


Abb. 27: Kompetition von Diäthylstilböstrol, Östradiol und Mestranol mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiol-receptors. Angaben in Prozent der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente ohne Zugabe einer verdrängenden Substanz. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 113 mit einem Proteingehalt von 20,9 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4^{o}C; 120 min.

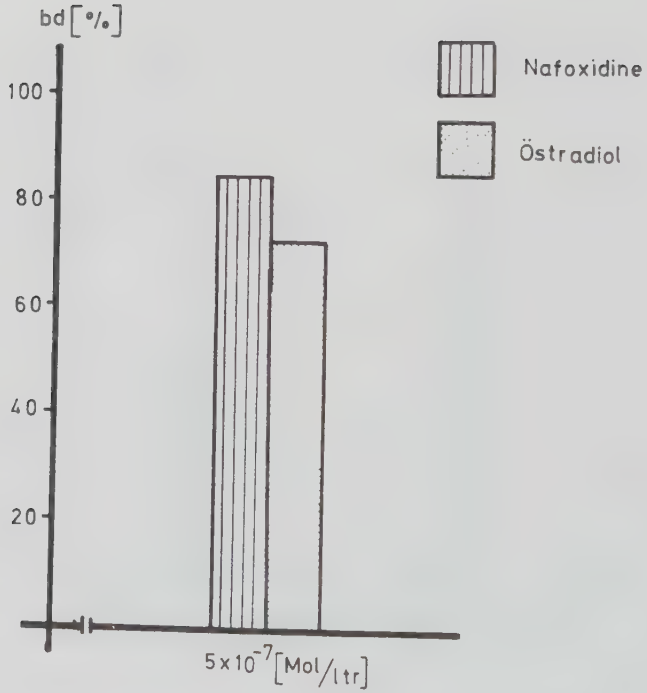


Abb. 28: Kompetition des synthetischen Antiöstrogen Nafoxidine und des Östradiol mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Angaben in Prozent der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente ohne Zugabe einer verdrängenden Substanz.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 111 mit einem Proteingehalt von 19,1 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4°C; 120 min.

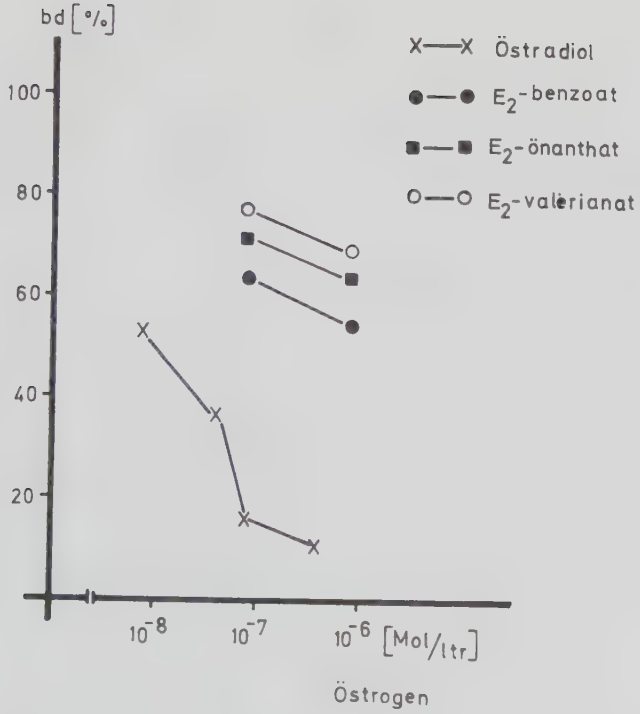


Abb. 29: Kompetition der Östrogenester Östradiolbenzoat,-valerianat, -önanthat und des Östradiol mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Angaben in Prozent der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente ohne Zugabe einer verdrängenden Substanz.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 108 mit einem Proteingehalt von 18,0mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 9 x 10^{-9}molar; 4°C; 120 min.

ne untersucht. Wie aus Abb. 30 hervorgeht, erfolgt selbst bei einer Progesteronkonzentration von 6×10^{-6} Mol/ltr keine Verdrängung des ^{3}H-Östradiol von seinem Receptor. Auch die synthetischen Gestagene zeigten bis zu einer Konzentration von 6×10^{-6} Mol/ltr keinen verdrängenden Effekt (Abb. 31). Die in Abb. 31 dargestellte Kompetitionsstudie, der ein einziges Cytosol zugrunde lag, ließ eindeutig erkennen, daß auch die Acetate der synthetischen Gestagene keine Affinität zur 8S-Komponente des Östradiolreceptors haben. Diese Befunde bestätigten sich in einer zweiten Untersuchungsreihe mit einem anderen Cytosol.

III. 4. c) Mit anderen Steroiden

Ob Affinitäten zwischen Kortikoiden und der 8S-Komponente des Östradiolreceptors bzw. zwischen Androgenen und der 8S-Komponente des Östradiolreceptors bestehen, wurde durch Kompetitionsstudien mit folgenden Steroiden überprüft: Cortisol, Dexamethason, Dihydrotesteosteron, Dehydroepiandrosteron, 5α -Androstan-3α, 17β-diol, 5α -Androstan-3α , 17α -diol, 5α -Androstan-3ß, 17ß-diol und 5α -Androstan-3ß, 17α -diol. Keine der untersuchten Substanzen zeigte eine Beziehung zur 8S-Komponente des Östradiolreceptors (Abb. 32).

III. 4. d) Mit Digitalispräparaten

Die Beobachtung,daß Herzglykoside mit einer östrogenartigen Wirkung einhergehen, ist in der Literatur des öfteren gemacht worden.Ob Digitalispräparate überhaupt einen direkten östrogenartigen Effekt ausüben können, wurde durch kompetitive Untersuchungen an der 8S-Komponente des Östrogenreceptors geprüft. Wie aus Abb. 33 hervorgeht, war ein verdrängender Effekt bis zu einer Konzentration von 6×10^{-7} Mol/ltr im Inkubationsmedium weder vom Digoxin noch vom Digitoxin nachweisbar. Das gleiche galt für die Bisglycoside, Mono-

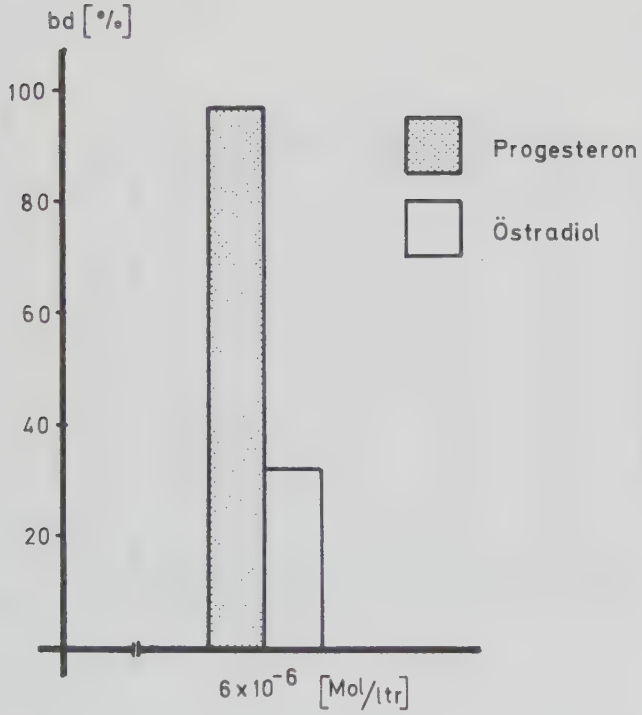


Abb. 30: Kompetition von Progesteron und Östradiol mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Angaben der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente ohne Zugabe einer verdrängenden Substanz.
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 113 mit einem Proteingehalt von 20,9 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4°C; 120 min.

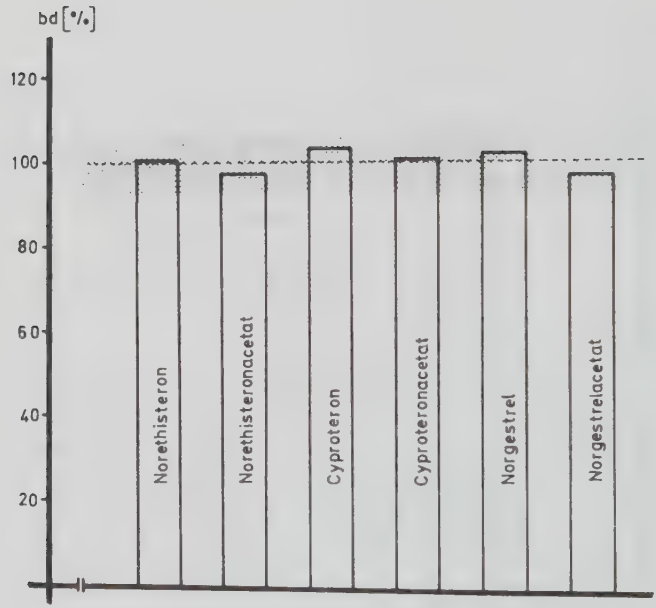


Abb. 31: Kompetition von Norethisteron, Cyproteron und Norgestrel sowie ihrer Acetate bei jeweils einer Konzentration von 9×10^{-7} molar im Ansatz mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Angaben in Prozent der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente ohne Steroidzugabe. Grauzone: Siehe Abb. 15.

Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 101 mit einem Proteingehalt von 10,9 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration in dem Ansatz 9×10^{-9} molar; 4^{o}C; 120 min.

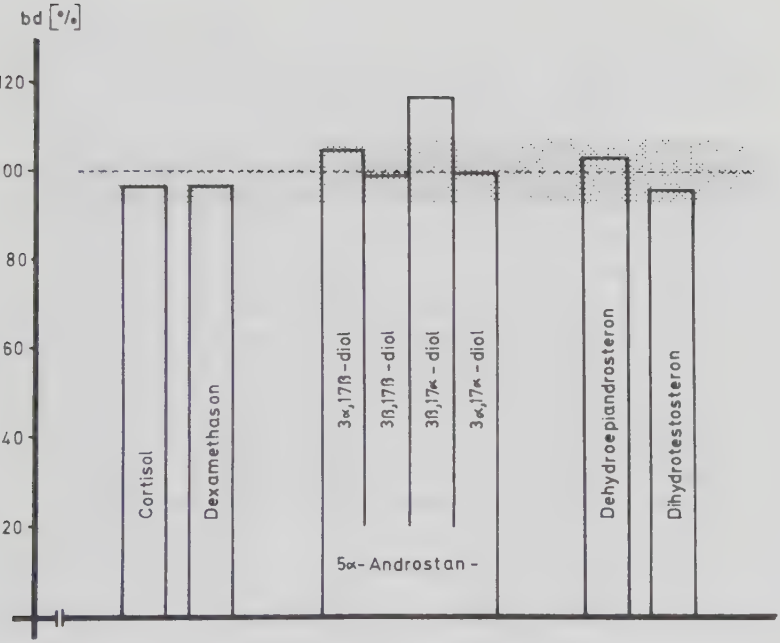


Abb. 32: Kompetition von Cortisol und Dexamethason, von 5α-Androstandiol und seiner 3,17-Stereoisomere (3α, 17α; 3β, 17α; 3α, 17β; 3β 17β), von Dihydrotestosteron und Dehydroepiandrosteron bei jeweils einer Konzentration von 6×10^{-6} molar im Ansatz mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolrezeptors. Angaben in Prozent der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente ohne Steroidzugabe. Grauzone: Siehe Abb. 15
Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 112 mit einem Proteingehalt von 15,8 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6×10^{-8} molar; 4°C; 120 min.

glycoside und die Aglycone. Die Dihydroverbindungen von Digoxin, Digitoxin und den entsprechenden Aglyconen wirken ebenfalls nicht verdrängend (Abb. 34).

III. 5. Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors unter Berücksichtigung des Funktionszustandes des Endometriums

Das Endometrium eines jeden in der Studie verwandten Uterus wurde histologische untersucht und hinsichtlich seines Funktionszustandes beschrieben. Die Zuordnung der spezifischen Bindung bei vorgegebener Östradiolkonzentration zu einem histologisch definierten Funktionszustand war in 21 Fällen möglich. 14 Präparationen stammten von Frauen mit zyklischer Ovarialfunktion, sieben von Frauen in der Postmenopause. Neun der 14 Fälle von zyklischer Ovarialfunktion befanden sich in der Proliferationsphase und fünf in der Sekretionsphase. Es fiel auf, daß die Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente des Receptors in den postmenopausalen Fällen erheblich höher lag als in den übrigen. Ferner fiel auf, daß die Bindung an die 8S-Komponente in der Proliferationsphase stärker war als in der Sekretionsphase (Abb. 35).

Vergleicht man den Eiweißgehalt im Cytosol in den einzelnen Gruppen,so zeigt sich im Mittel kein großer Unterschied. Während die Streuung des Eiweißgehaltes der Cytosole der postmenopausalen Fälle groß war, war sie in den Fällen mit zyklischer Ovarialfunktion, insbesondere in der Sekretionsphase, gering (Abb. 36). Da die Unterschiede in den Eiweißgehalten der Cytosole in den einzelnen Gruppen gering waren, blieb das Ergebnis der Studie unabhängig davon, ob der Eiweißgehalt berücksichtigt wurde (Abb. 37) oder nicht (Abb. 35). Der deutliche Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen blieb auf jeden Fall bestehen. Zwei der postmenopausalen Fälle waren

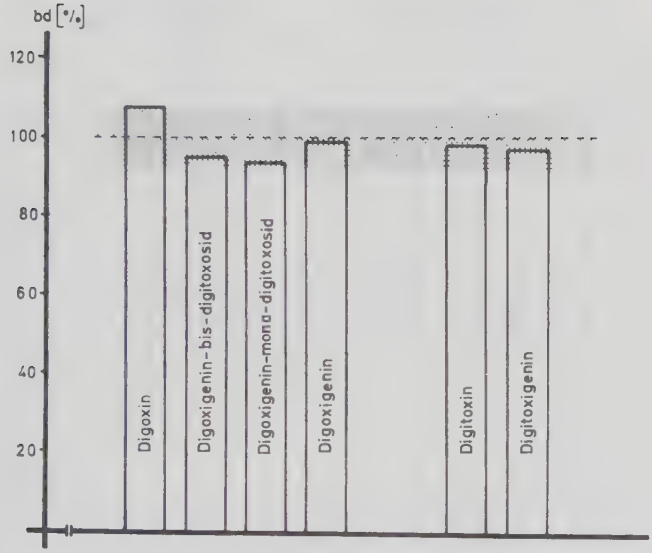


Abb. 33: Kompetition von Digoxin und Digitoxin und von vier ihrer Metaboliten (Digitoxigenin, Digoxigenin, Digoxigenin-mono-digitoxosid, Digoxigenin-bis-digitoxosid) bei jeweils einer Konzentration von 6 x 10^{-7} molar im Ansatz mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Angaben in Prozent der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente ohne Digitaliszugabe. Grauzone: Siehe Abb. 15. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 113 mit einem Proteingehalt von 20,9 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8} molar; 4°C; 120 min.

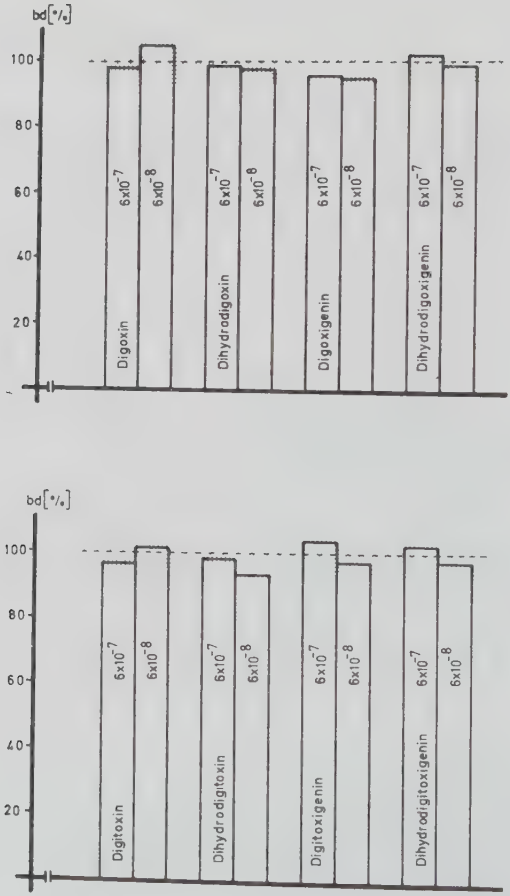


Abb. 34: Kompetition von Digoxin,Digitoxin und ihrer Dihydroverbindungen mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Angaben in Prozent der Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente ohne Digitaliszugabe.Grauzone: Siehe Abb.15. Inkubationsbedingungen: Cytosol Nr. 114 mit einem Proteingehalt von 14,3 mg/ml; ^{3}H-Östradiolkonzentration im Ansatz 6 x 10^{-8}molar; 4^{o}C; 120 min.

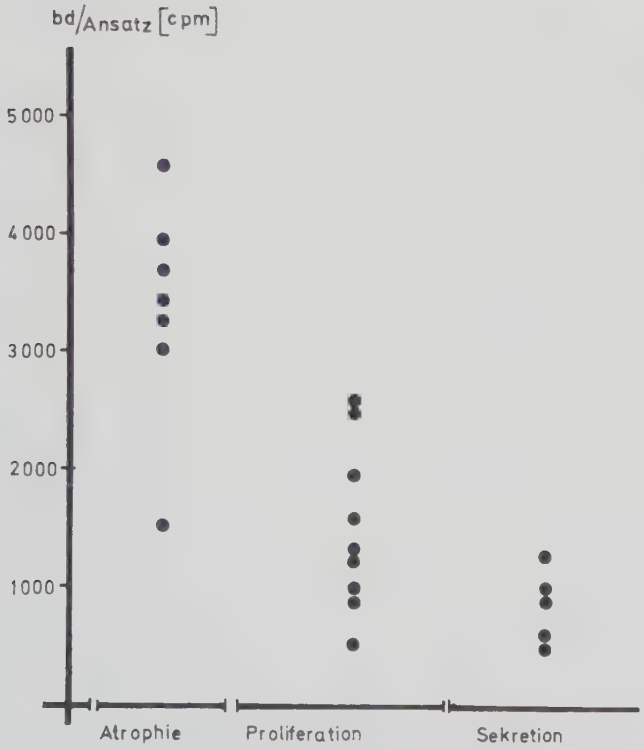


Abb. 35: Die Bindung von ^{3}H-Östradiol (6 x 10^{-8} molar im Ansatz) an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors (bd = gebunden) in Abhängigkeit von dem histologisch beschriebenen Funktionszustand des Endometriums.

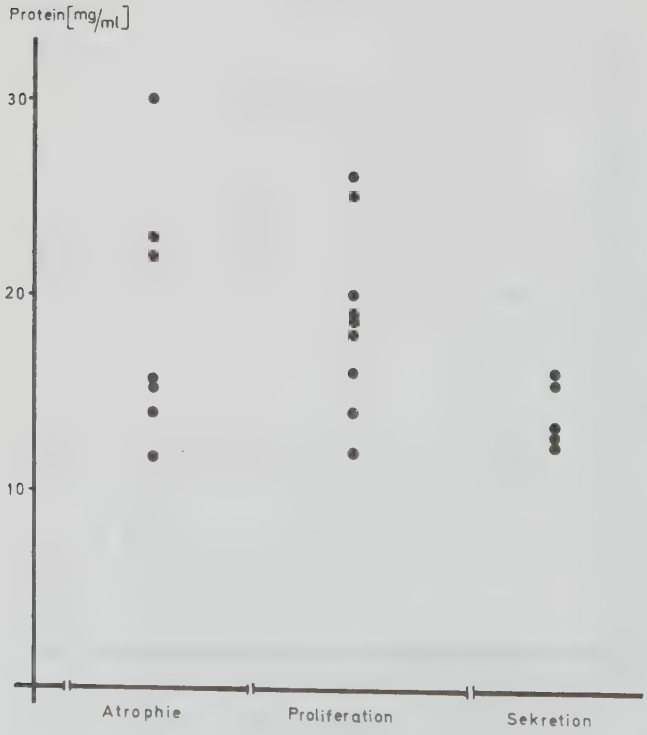


Abb. 36: Der Proteingehalt der Cytosole in Abhängigkeit von dem histologisch beschriebenen Funktionszustand des Endometriums.

Abb. 37: Die Bindung von ^{3}H-Östradiol an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors pro mg Cytosolprotein, in Abhängigkeit von dem histologisch beschriebenen Funktionszustand des Endometriums.

mit Östrogenen vorbehandelt. Sie zeigten den entsprechenden Proliferationszustand im Endometrium und wiesen in ihrer Gruppe die geringsten Konzentrationen an freier 8S-Komponente des Östradiolreceptors auf.

IV. Diskussion

IV. 1. Zur Methodik

Zum Nachweis der Östradiolreceptoren sind verschiedene Methoden benutzt worden. Die Methoden unterscheiden sich hauptsächlich in dem Verfahren zur Trennung von freiem und gebundenem Hormon. Folgende Trennverfahren haben sich im Umgang mit tierischem Gewebe als besonders praktikabel erwiesen: Adsorption des freien Hormons an Aktivkohle (Korenman 1969); Adsorption des Hormon-Receptorkomplexes an Glasstaub (Clark u. Gorski 1969); Fällung des Hormon-Receptorkomplexes durch Protamin (Steggles u. King 1970); Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten (Toft u. Gorski 1966); Agargelektrophorese (Wagner 1972) und die Sephadexgelchromatographie (Puca u. Brescani 1968). Untersuchungen mit menschlischem Gewebe stellen besondere Anforderungen an das Trennverfahren: zum einen hat nicht nur eine Trennung von freiem und gebundenem Steroid stattzufinden, sondern möglichst auch eine Trennung verschiedener hormonbindender Eiweißkomponenten wie z.B. Albumin, SHBG und Receptorprotein - zum anderen muß die Analyse des Receptorgehaltesauch aus kleinsten Cytosolmengen, z.B. aus Biopsien, erfolgen können.

Korenman (1969) führte die Trennung von freiem und gebundenem Steroid mittels dextranüberzogener Holzkohle durch. Hierbei wird freies Hormon, ebenso wie weniger spezifisch gebundenes Hormon an die dextranüberzogene Holzkohle adsorbiert, während das spezifische gebundene Hormon im Überstand bleibt und dort bestimmt werden kann. Dieses Verfahren macht eine hohe Endverdünnung des Cytosols (1 : 10) notwendig, da sonst Störungen der Adsorption durch die im Cytosol vorhandenen Eiweiße auftreten können. Da der Receptorbestand im menschlichen Gewebe z.T. wesentlich geringer ist als in tierischem, ist diese

Methode zur Analyse des Receptorbestandes in menschlichem Gewebe nicht besonders geeignet. Zusätzlich beträgt nach Jungblut et al. (1972) die Receptorausbeute nur 50% - 60% derjenigen bei Sephadexgelchromatographie. Von Nachteil ist ferner, daß weniger spezifisch bindende Eiweiße, besonders SHBG nicht vollständig "gestrippt" werden und zu falsch positiven Ergebnissen führen können (Wagner u. Jungblut 1976).

Clark und Gorski (1969) führten die Trennung von freiem und gebundenem Steroid mittels Glasstaub durch. Hierbei lagert sich der Hormon-Receptorkomplex an den Glasstab an, der dann bei Zentrifugation sedimentiert. Durch wiederholtes Auswaschen mit Puffer wird freies Hormon aus dem Sediment entfernt. Anschließend wird der Hormon-Receptorkomplex mit Äthanol extrahiert. Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, daß außer dem Hormon-Receptorkomplex auch andere Hormon-Eiweißkomplexe an den Glasstaub fixiert werden, denn bei Einsatz von Cytosol, das vor der Inkubation erhitzt wurde und so seine Östradiolreceptoren verloren haben mußte, reduzierte sich die vom Glasstaub extrahierbare Radioaktivität nicht um 100% sondern nur um ca. 75% (Jungblut et al. 1972).Da im menschlichen Gewebe nicht nur mit der Gegenwart von Receptorproteinen sondern auch von anderen bindenden Eiweißen zu rechnen ist, die sich ebenfalls an Glasstaub adsorbieren können, erscheint diese Methode zur Untersuchung menschlichen Gewebes wenig geeignet. Es besteht die Gefahr falsch positiver Ergebnisse.

Steggles und King (1970) führten die Trennung von freiem und gebundenem Östradiol durch Fällung des Hormon-Receptorkomplexes mit einer 0,75% Protaminlösung durch. Dabei wird die 8S-Bindung komplett und die 4S-Bindung teilweise gefällt. Dieses Verfahren gewährleistet jedoch nicht, daß ausschließlich der Hormon-Receptorkomplex gefällt wird, es ist auch möglich, daß z.B. SHBG gebundenes Hormon bei der Fällung mit

erfaßt wird, so daß auch hier die Gefahr falsch positiver Ergebnisse besteht (Jungblut et al. 1972).

Bei der Dichtezentrifugation über einen Saccharosegradienten (Toft u. Gorski 1966) gelingt die Darstellung der beiden Receptorgruppen, der 4S-Komponente und der 8S-Komponente ideal. Die 8S-Komponente ist jedoch in der Lage, größere Aggregate zu bilden, die bei der Zentrifugation sedimentieren und sich dadurch einem Nachweis entziehen. Durch dieses Phänomen können falsch negative Ergebnisse bei der Bestimmung des 8S-Receptorgehaltes hervorgerufen werden (Jungblut et al. 1972). Eine Differenzierung zwischen 4S-Komponente und SHBG ist auf Grund gleichen Sedimentationsverhaltens nicht möglich (Wagner 1972).

Weit verbreitet ist die Trennung von freiem und gebundenem Hormon mittels der Agargelelektrophorese (Wagner 1972). Während der Elektrophorese bleibt das spezifisch gebundene Hormon in seiner Bindung fixiert. An Albumin angelagertes Hormon wird während des Trennungsvorgangs aus seiner Bindung freigesetzt. Albumin und Receptorprotein wandern auf Grund ihrer negativen Gesamtladung zur Anode. SHBG, ein ß-Globulin, wandert ebenso wie freies Hormon zur Kathode. Eine Auftrennung der beiden Receptorkomponenten durch die Agargelelektrophorese gelingt nicht. Es kann nur der Gesamtreceptorgehalt bestimmt werden. Differenzierte Aussagen über das Verhalten des 8S-Receptors sind mit dieser Methode nicht möglich (Wagner 1972).

Von ähnlicher Effektivität bei der Trennung von gebundenem und freiem Hormon ist die Sephadexgelchromatographie. Nach Jungblut et al. (1972) ist eine Auftrennung zwischen den bindenden Receptorproteinen und SHBG bei der Sephadexgelchromatographie auf der Säule (Puca u. Brescani 1968) nur oberhalb von Sephadex G 100 möglich. Wird die Sephadexgelchromatographie an der Säule durchgeführt, so ist als besonderer Nachteil bei der Untersuchung von menschlichem Gewebe die relativ große

Cytosolmenge anzusehen, die für eine Analyse benötigt wird (0,9 ml). Durch Dünnschichtchromatographie mit Sephadex kann der Cytosolbedarf auf 0,08 ml für eine Doppelanalyse gesenkt werden wie aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht. Diese Cytosolmenge läßt sich aus 0,1 g Gewebe gewinnen. Damit ist die Dünnschichtgelchromatographie mit Sephadex, ähnlich wie die Agargelelektrophorese, zur Untersuchung von menschlichem Gewebe besonders geeignet. Im Gegensatz zur Agargelelektrophorese ermöglicht die Sephadexdünnschichtgelchromcatographie eine Auftrennung des Receptorproteins in 8S- und 4S-Komponente.

Die optimalen Bedingungen zur Darstellung des cytoplasmatischen Östradiol-Receptorkomplexes unterscheiden sich in den oben angegebenen Arbeiten z.T. recht erheblich. Besonders stark unterscheiden sich die Inkubationstemperatur, die Inkubationsdauer und der pH-Wert des Inkubationsmediums bei der Inkubation. Im allgemeinen wird bei niedrigen Inkubationstemperaturen länger inkubiert. Lee und Jacobson (1971) inkubierten den cytoplasmatischen Östradiolreceptor des Rattenuterus bei $0^{o}C$ - $4^{o}C$ über 1,0 - 1,5 Stunden. Andere Untersucher inkubierten bei derselben Temperatur erheblich länger: Harrison und Toft (1975) führten Untersuchungen an Hühnertuben mit einer Inkubationsdauer von 20 Stunden durch; Markler u. Eisenfeld (1974) inkubierten menschliches Endometriumcytosol über 24 Stunden; fast identische Inkubationsbedingungen benutzten McGuire et al. (1972) bei Untersuchungen von menschlichem Myometrium. Pollow et al. (1975) inkubierten menschliches Endometriumcytosol bei $4^{o}C$ über zwei Stunden. Im Gegensatz zu den eben zitierten Untersuchungen führten Hähnel et al.(1973) und Evans u. Hähnel (1973) ihre Inkubation mit humanem Uterusgewebe bei $25^{o}C$ über nur 30 Minuten durch. Die eigenen Untersuchungen des Temperatur-Zeit-Profils zeigten,daß die 8S-Komponente des Receptors bei $4^{o}C$ optimal bindet, wobei sich das Bindungsgleichgewicht nach 1,5 - 2,0 Stunden eingestellt hat.

Aus diesem Grunde haben wir auf eine längere Inkubationszeit verzichtet. Bei längeren Inkubationszeiten bleibt der Gleichgewichtszustand während 24 Stunden erhalten (siehe auch Abb.: 9,10). Gegen die Inkubation bei 25°C spricht die Wärmelabilität des Östradiolreceptors. Nach den eigenen Untersuchungen (siehe auch Abb. 14) wurde die Bindungsfähigkeit der 8S-Komponente des Östradiolreceptors durch eine einstündige Vorinkubation bei 20°C um 70% reduziert. Eine ähnlich große Hitzeempfindlichkeit des Receptorproteins aus Ratenuteri konnten Peck et al. (1973) nachweisen. Sie berichteten von einer Verminderung der Bindungsfähigkeit um 85%, wenn das Cytosol bei 37°C über zwei Stunden vorinkubiert worden war. Die Wärmelabilität des Receptors kann auch zur Interpretation der eigenen Ergebnisse herangezogen werden, nach denen die Inkubation des Cytosols mit ^{3}H-Östradiol bei 37°C ein geringeres Bindungsvermögen erkennen ließ als bei 4°C und bei deren weiterem Verlauf die Bindungsfähigkeit stark abnahm (siehe auch Abb. 9).

Der pH-Wert, der zur Untersuchung des cytoplasmatischen Östradiolreceptors laut Literatur benutzt wurde, variiert zwischen pH 7.0 und pH 8.0: Lee und Jacobson (1971) und Markler u. Eisenfeld (1974) inkubierten mit Tris-EDTA-Puffer bei pH 7.4; Harrison und Toft (1975) inkubierten mit Tris-EDTA-Thioglycerol-Puffer bei pH 7.5; McGuire et al. (1972) inkubierten mit Tris-EDTA-Puffer bei einem pH 8.0. Detaillierte Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit liegen in dieser Arbeit vor sowie in den Veröffentlichungen von Ellis u. Ringold (1971), Pollow et al. (1975) und Hähnel (1971). Eigene Unteruchungen zeigten optimale Bindungseigenschaften bei einem pH von 7.0 (Abb. 12). Dieses Ergebnis steht in Obereinstimmung mit demjenigen von Pollow et al. (1975) für menschliches Endometrium. Der pH-Wert von 7.0 entspricht dem physiologischen intracellulären pH-Wert. Ellis u. Ringold (1971) fanden bei der Inkubation von Cytosol aus Rattenuteri mit Phosphatpuffer einen pH-Wert von 7.5 als optimal. Ein pH-Wert von 8.0 wie er

von Hähnel (1971) für humanes Uterusgewebe angegeben wird, stellt nach eigenen Untersuchungen die ideale Inkubationsbedingung für die bindenden Proteine des Radioaktivitätsgipfel II dar, zu denen u.a. Albumin und SHBG gehören. Pollow et al. fanden für menschliches Plasmaalbumin einen optimalen pH-Wert von 9.5. Es ist anzunehmen, daß die pH-Charakteristik von der Qualität des Trennverfahrens sehr stark abhängt.

Der Zusatz von p-Hydroxymercuribenzoat in einer Konzentration von 10^{-3} molar hebt die Bindungsfähigkeit des Receptorproteins auf; wird es nach vollendeter Inkubation mit Östradiol zugesetzt, so dissoziieren die Östradiol-Receptorkomplexe (Jensen et al. 1967). Junglbut et al. (1967) vermuten, daß dieser Effekt durch eine direkte Einwirkung auf die Sulphydrylgruppen des Receptors zustande kommt. Zum Schutz der Sulphydrylgruppen vor Oxidation zu Disulfidbrücken führte Cleland (1964) die Substanz Dithioerythrit ein. Ratajczak und Hähnel (1974) wiesen einen protektiven Effekt von 10^{-3}molarem Dithioerythrit bei der Aufbewahrung von humanem Myometriumcytosol bei 4^{o}C und bei der Lagerung bei -20^{o}C für die Bindungsfähigkeit nach. Der Verlust der Bindungsfähigkeit, der durch Lagerung bei 4^{o}C ohne Protektor auftrat, konnte durch nachträgliche Gabe von Dithioerythrit (10^{-3}molar) teilweise ausgeglichen werden. Deshalb wurde in dieser Studie in Gegenwart von Dithioerythrit (10^{-3} molar) das Cytosol präpariert und aufbewahrt. Die eigenen Untersuchungen zeigten, daß eine weitere Steigerung der Dithioerythritkonzentration im Inkubationsmedium keine Zunahme der Bindung an die 8S-Komponente erbrachte (siehe auch Abb. 18).

Bei vergleichenden Untersuchungen der Receptorkapazität muß die Lagerungsfähigkeit bekannt sein, wenn die Inkubation nicht sofort nach Aufarbeitung des Cytosols erfolgt. In der Literatur werden verschiedene Angaben über die Lagerungsfähigkeit gemacht. Evans et al. (1974) stellten bei ihrem Cytosol aus humanem Uterus eine Abnahme der Bindungskapazität trotz Lagerung bei -20^{o}C innerhalb eines Tages fest, so daß sie es für

unmöglich hielten, Versuche mit dem gleichen Cytosol zu wiederholen. Eine Lagerung bei -20°C über 10 Tage führte bei humanem Cytosol des Myometriums zu keinem Bindungsverlust, wenn dem Cytosol Dithioerythrit zugesetzt worden war (Ratajczak u.Hähnel 1974). Auch in dieser Studie zeigte sich der Östradiolreceptor über 10 Tage stabil, wenn er bei -20°C und Zusatz von Dithioerythrit aufbewahrt wurde. Von organisatorischem Vorteil wäre es, wenn man das gewonnene Gewebe nicht direkt aufarbeiten, sondern in tiefgefrorenem Zustand aufbewahren könnte. Ein solches Vorgehen haben Lee und Jacobson (1971) bei Untersuchungen am Cytosol des Rattenuterus beschrieben sowie Poortman et al. (1977) für humanes Myometrium. Untersuchungen, die diese verschiedenen Prozeduren direkt miteinander vergleichen, sind uns zur Zeit nicht bekannt.

Eine Steigerung der Ionenkonzentration im Inkubationsmedium durch 0,3 molar KCl führt zu einer Dissoziation des 8S-Receptors in 4,5S-Einheiten. Diese 4,5S-Receptoreinheiten zeigten bei der Gelauftrennung über G 200 gleiches Elutionsverhalten wie Rinderalbumin (Puca et al. 1971). Die eigenen Untersuchungen zeigten eine Abnahme des Radioaktivitätsgipfel III mit zunehmender KCl-Konzentration im Inkubationsmedium. Die Abnahme des Radioaktivitätsgipfel III wurde von einer deutlichen Zunahme der Radioaktivität im Bereich II begleitet. Dieser Verschiebung dürfte eine Dissoziation des 8S-Receptors in niedermolekulare Einheiten entsprechen. Die eigenen Untersuchungen zeigten auch, daß die Variation der K^+-Konzentration im Cytosol, wie sie von Präparation zu Präparation beobachtet wird, den 8S-Receptorgehalt nur unwesentlich beeinflußt. Die Sedimentationseigenschaft des Receptors hängt im übrigen nicht nur von der K^+-Konzentration, sondern u.U. auch von der Temperatur ab, bei der aufgearbeitet und inkubiert wird (Brecher et al. 1970, Gschwendt u. Hamilton 1972).

Wird das Receptorprotein nicht isoliert, sondern in Gegenwart von anderen bindenden Eiweißen inkubiert, so wäre es ideal, nicht nur eine Trennung von freiem und gebundenem Hormon zu erreichen, sondern auch eine Abtrennung der verschiedenen bindenden Eiweißfraktionen voneinander. Mit Hilfe der Sephadexgelchromatographie gelingt zumindest eine Auftrennung des Receptorproteins in seine 8S- und 4S-Komponente, zugleich eine Abtrennung der 8S-Komponente von allen anderen bindenden Proteinen. Der Erfolg der Auftrennung hängt von der Art des Sephadexgels ab. Bei der hier vorliegenden Studie gelang eine einwandfreie Abtrennung zwischen der 8S-Komponente des Receptorproteins und den anderen bindenden Eiweißen nur durch die Filtration über Sephadex G 150. Bei Verwendung von G 150 wurde die 8S-Komponente des Östradiolreceptors in der durch das Gel ausgeschlossenen Phase mitgeführt, während die anderen Eiweiße im Gel retiniert wurden. Bei Verwendung von G 50 gelang eine solche Auftrennung der Eiweißfraktionen nicht.

Vreeburg et al. (1975) benutzten zur Bestimmung des Receptorgehaltes im Cytosol von verschiedenen Hirnregionen der männlichen Ratte die Gelchromatographie mit Sephadex G 25. Dadurch konnten sie das gebundene vom freien Hormon abtrennen, nicht jedoch die verschiedenen Eiweißfraktionen. Den Gesamtreceptorbestand ermittelten sie indirekt durch Subtraktion des unspezifisch gebundenen Hormon vom gesamtgebundenen Hormon. Zur Bestimmung des unspezifisch gebundenen Hormons wurde der Receptor durch einen 300-fachen Überschuß an "kaltem" Hormon abgesättigt. Die Bestimmung über die Sephadexgelfiltration mit G 25 wird auf Grund der Notwendigkeit zur Fraktionierung zu einem aufwendigen Verfahren.

IV. 2. Zur Kinetik

Die Bestimmung des Receptorgehaltes bei $4^{o}C$ kann nur diejenigen Receptoren erfassen, die nicht durch endogenes Hormon be-

setzt sind. Eine relevanter Austausch zwischen receptorgebundenem und freiem Hormon findet bei 4°C nicht statt (Katzenellenbogen et al. 1973). Hierzu ist nach Jensen et al. (1967) eine Inkubationstemperatur von 38°C notwendig. Je höher die endogene Hormonkonzentration zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme ist, um so geringer muß die Bindungskapazität des Cytosols für exogenes sein. Das endogene Hormon kann noch auf einem anderen Wege das Ergebnis verfälschen. Durch das im Cytosol vorhandene Hormon wird die spezifische Radioaktivität des zugesetzten Hormons reduziert. Ist die endogene Hormonkonzentration nicht bekannt oder wird sie nicht berücksichtigt, wird eine zu hohe spezifische Radioaktivität angenommen. Folglich wird die spezifische Bindungskapazität des Cytosols, nach Scatchard berechnet, zu gering ermittelt.

Bei den eigenen Untersuchungen schwankte die Bindungskapazität der 8S-Komponente des Östradiolreceptors zwischen 3,7 x 10^{-14} Mol/mg Protein und 16,2 x 10^{-14} Mol/mg Protein. Die eigenen Untersuchungen erlauben es allerdings nicht, eine Aussage über den Anteil der 8S-Komponente am Gesamtreceptorbestand zu machen.Krishnan et al. (1973) untersuchten menschliches Myometrium und ermittelten eine Gesamtbindungskapazität von 84 x 10^{-14} Mol/mg Protein. Für Cytosole aus Kalbsuteri errechneten Puca und Brescani (1969) die Anzahl der spezifischen Bindungsstellen auf 3,3 - 6,5 x 10^{-13} Mol/mg Protein. Harrison und Toft (1975) untersuchten die spezifische Bindungskapazität von Hühnereileitern und ermittelten einen Wert von 1 x 10^{-13} Mol/mg Protein. Aus diesen Beispielen ist ersichtlich, daß die Anzahl der spezifischen Bindungsstellen bei tierischem Untersuchungsmaterial höher liegen dürfte als bei menschlichem Gewebe. Diese quantitativen Aussagen sind jedoch mit großer Vorsicht zu bewerten, da die Bezugsgröße - in diesem Fall der Proteingehalt des Cytosols - nicht ausreichend charakterisiert ist und die endogenen Hormonkonzentrationen nicht berücksichtigt sind.

Im Gegensatz zu dem Receptorgehalt verschiedener Gewebe verschiedener Spezies liegen die Angaben zu der Bindungsaffinität sehr viel näher beieinander. Nach unseren Untersuchungen liegt die Affinitätskonstante K_{ass} der 8S-Komponente des Östradiolreceptors des humanen Myometriums im Bereich von $0,3 \times 10^8$ l/Mol bis 5×10^8 l/Mol. In anderen Laboratorien wurden bei Untersuchungen von menschlichem Gewebe folgende Affinitätskonstanten ermittelt: $2,1 \times 10^9$ l/Mol für den Östradiolreceptor des humanen Myometriums (Krishnan et al. 1973); $4,1 \times 10^9$ l/Mol für den Östradiolreceptor des humanen Endometriums (Markler u. Eisenfeld 1974) und $0,9 - 2,6 \times 10^9$ l/Mol für den Östradiolreceptor der humanen Cervix (Sandborn et al. 1975). Tierexperimentelle Untersuchungen der Affinitätskonstanten ergaben z.B. folgende Werte: $1,3 - 1,5 \times 10^9$ l/Mol am Kalbsuterus (Puca u. Brescani 1969) und 1×10^9 l/Mol am Rattenuterus (Vreeburg et al. 1975).

IV. 3. Zur Pharmakologie

Neben der geringen Kapazität (10^{-14} Mol/mg Protein) und der hohen Affinität (10^8 l/Mol) zeichnet sich die Hormon-Receptorbindung durch eine starke Substratspezifität aus. Die Substratspezifität der 8S-Komponente des Östradiolreceptors ließ sich auch in dieser Studie nachweisen. Ausgeprägte Konkurrenz mit ^{3}H-Östradiol um die Bindung an die 8S-Komponente des Östradiolreceptors zeigten bei den eigenen Untersuchungen nur die Östrogene (siehe auch Abb. 24 - 27). Unter den natürlichen Östrogenen zeigten Östradiol und Östriol eine annähernd gleiche Affinität zum 8S-Receptor, die des Östrons war deutlich schwächer. Unter den synthetischen Östrogenen zeichnete sich das Äthinylöstradiol dadurch aus, daß es markiertes Östradiol stärker verdängte als Östradiol selbst. Diäthylstilböstrol hatte eine ähnliche Affinität zum Receptor wie Östradiol, Mestranol eine deutlich geringere. Sandborn et al. (1975) untersuchten ebenfalls die Affinität von Östrogenen (Östradiol,

Östriol,Östron, Äthinylöstradiol, Diäthylstilböstrol und Mestranol) zum Östradiolreceptor. Sie benutzten das Cytosol der humanen Cervix und kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Im Gegensatz dazu fanden Notides et al. (1972), daß Äthinylöstradiol eine geringere Affinität zum Östradiolreceptor hatte. Sie benutzten bei ihren Untersuchungen den menschlichen Uterus, ohne dabei zwischen verschiedenen Strukturen zu unterscheiden. Puca et al. (1971) wiesen im Cytosol des Kalbsuterus nach, daß Diäthylstilböstrol eine höhere Affinität zum Östradiolreceptor als Östradiol selbst hatte. Das als Antiöstrogen verwandte Nafoxidine zeigte in dieser Studie im Vergleich zu Östradiol eine geringe Affinität zum Receptor. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Resultaten von Notides et al. (1972), Hähnel (1971) und Puukka et al. (1976), die alle an menschlichem Uterusgewebe gewonnen wurden.

Das Verhalten von hydrophilen Östradiolkonjugaten zum Östradiolreceptor wurde ausführlich von Hähnel et al. (1973) untersucht. Sie benutzten das Cytosol des humanen Uterus. Die Östradiolsulfate wiesen unabhängig davon, ob die Sulfatgruppe in C_3 oder C_{17} Position stand, keinen verdrängenden Effekt auf die Bindung von ^{3}H-Östradiol am Östradiolreceptor auf. Gleiches traf für die Östradiolglucuronate zu. Eine Ausnahme bildete hier das 17β-Östradiol-17β-glucuronat, das in Konzentrationen um 10^{-8} molar verdrängend am Östradiolreceptor wirkte.

Untersuchungen zum Bindungsverhalten von lipophilen Östradiolestern im menschlichen Gewebe liegen meines Erachtens nicht vor. In dieser Studie zeigten die Östradiolester wie Östradiolbenzoat, Östradiolönanthat und Östradiolvalerianat in Konzentrationen von 10^{-6} und 10^{-7} molar eine gewisse Verdrängung von ^{3}H-Östradiol von der 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Der verdrängende Effekt war jedoch verhältnismäßig schwächer, als dies für Östradiol nachgewiesen wurde. Diese

Ergebnisse sind mit Einschränkung zu sehen, da nicht geprüft wurde, inwieweit der Ester im Verlaufe der Inkubation gespalten wurde. Es bleibt offen, ob die nachgewiesene Verdrängung durch den Ester selbst oder durch möglicherweise freigesetztes Östradiol geschah.

Progesteron, sowie die synthetischen Gestagene Norgestrel, Norethisteron, Cyproteron und ihre Acetate wirkten in einem Konzentrationsbereich um 10^{-6} molar im Inkubationsmedium nicht verdrängend auf die Bindung von Östradiol an der 8S-Komponente des Östradiolreceptors (siehe auch Abb. 30,31). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Notides et al. (1972) mit Progesteron am humanen Uterus; Sandborn et al. (1975) mit Progesteron, Cyproteronacetat und Norethisteronacetat an der humanen Cervix; Puca et al. (1971) mit Progesteron am Kalbsuterus; Harrison und Toft (1975) mit Progesteron am Hühnereileiter und van Kordelaar et al. (1975) mit Progesteron und Norgestrel am Rattenuterus.

Androgene, wie Dihydrotestosteron, Dehydroepiandrosteron und die 3,17-Stereoisomere des 5α -Androstan-diol zeigten in dieser Studie keine Affinität zur 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Zu gleichen Ergebnissen gelangten Sandborn et al. (1975) mit Testosteron an der humanen Cervix und Notides et al. (1972) mit Dihydrotestosteron am humanen Uterus. Einen gering verdrängenden Effekt von 5α -Androstan-3β, 17β-diol konnten Notides et al. (1972) und Hähnel et al. (1973) am humanen Uterus nachweisen, während Dehydroepiandrosteron und 5α -Androstan-3α, 17β-diol keine Affinität zum Receptor aufwiesen. Poortman et al. (1977) berichteten über eine Affinität von Androsten-3β, 17β-diol zum Östradiolreceptor des Mammacarcinoms der Frau.

Die Ergebnisse von Hähnel et al.(1973) und Notides et al. (1972), nach denen Cortisol keine Affinität zum Östradiol-receptor des humanen Uterus aufwies, konnte durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Gleiches ließ sich auch für Dexamethason zeigen.

Die Aglycone der Digitalispräparate und Östradiol weisen eine Strukturähnlichkeit insofern auf, als beide das Sterangerüst als wesentlichen Bestandteil haben. Sie unterscheiden sich im Ring A des Steroidgerüstet und in der Substitution an C_{17}. Beim Östradiol ist Ring A ungesättigt, C_{17} trägt eine OH-Gruppe. Beim Digitalismolekül ist Ring A gesättigt und an C_{17} ein Laktonring angeschlossen. Bei in vivo Applikation wird den Digitalispräparaten ein östrogenartiger Effekt nachgesagt. Bei der Gabe von Digoxin an ovarektomierte Ratten zeigte sich eine deutlich trophische Reaktion des Uterus (Scott u. Read 1957). Es stellte sich eine Hyperämie ein; das Epithel erhöhte sich bei gleichzeitiger Vergrößerung der Zellkerne. Navab (1965) fand einen Zusammenhang zwischen der Einnahmedauer von Herzglykosiden und den östrogenartigen Auswirkungen auf das Endometrium bei Frauen in der Postmenopause. Alle untersuchten Patientinnen, die Digoxin in einer Dosis von 0,1 mg bis 0,2 mg täglich länger als zwei Jahre eingenommen hatten, wiesen einen Smear auf, der einen deutlichen Östrogeneinfluß erkennen ließ. Eine Störung der Leberfunktion war in keinem der untersuchten Fälle mit klinisch-chemischen Methoden nachweisbar. LeWinn (1963) beobachtete bei älteren Männern gehäuft Gynäcomastien unter Digitalistherapie.

Ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Digitaliseinnahme und den östrogenartigen Effekten besteht, ist zweifelhaft. Möglicherweise kommt es zu einer Verdrängung des Östradiols von spezifisch bindenden Plasmaeiweißen durch Digitalis. Die Möglichkeit einer Digitalis-Östrogenreceptor-Interaktion muß ebenfalls erwogen werden. Eine solche Interaktion wäre auch zwischen den zahlreichen Metaboliten der Digitalispräparate

und dem Östradiolreceptor denkbar. Die östrogenartigen Effekte könnten in den untersuchten Patientenkollektiven auch durch eine Störung des Östrogenstoffwechsels in der Leber aufgrund vorhandener pathologischer Veränderungen bedingt sein. Die Entwicklung von Gynäkomastien unter Digitalismedikation läßt auch auf einen Einfluß des Pharmakons auf die Prolaktinsekretion schließen.

Untersuchungen über die Bindung von Digitalis an spezifisch östrogenbindende Serumeiweiße liegen meines Wissens nicht vor. Die Ergebnisse zur Digitalis-Östradiolreceptor-Interaktion stellen sich in der Literatur widersprüchlich dar. Riffka et al.(1976) wiesen eine deutliche Hemmung durch Digitoxin nach. Der verdrängende Effekt konnte allerdings erst in einer Konzentration von 0,5 - 2,0 x 10^{-6} molar nachgewiesen werden. Für Digoxin ließ sich ein solcher Effekt auch in dieser Konzentration nicht nachweisen. Auch Stoffer et al. (1973) konnten keine Affinität von Digoxin zum Östradiolreceptor des Rattenuterus nachweisen, obgleich bei in vivo Untersuchungen eine leichte östrogenartige Wirkung festzustellen war. Die eigenen Untersuchungen mit Cytosol des humanen Myometriums ließen ebenfalls keine Affinität zwischen Digitalispräparaten (Digoxin, Digitoxin, ihren Aglyconen und Dihydroverbindungen in einer Konzentration von 6 x 10^{-7} molar) und dem 8S-Östradiolreceptor erkennen. Eine direkte Wirkung von Digitalis auf den 8S-Östradiolreceptor ist somit auszuschließen, zumal der Serumspiegel bei therapeutischer Dosierung für Digoxin üblicherweise zwischen 0,9 x 10^{-9} molar und 2,5 x 10^{-9} molar und für Digitoxin zwischen 13 x 10^{-9} molar und 39 x 10^{-9} molar liegt (Doherty 1968).

IV. 4. Zur Biologie

In dieser Studie zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Östradiolreceptorbestand des Uterus gemessen an der 8S-Kompo-

rente und der Zyklusphase. Der Receptorgehalt des Cytosols, bezogen auf den Proteingehalt, war in der Sekretionsphase eindeutig geringer als in der Proliferationsphase. Der höchste Receptorgehalt wurde in Uteri gefunden, die keiner zyklischen Ovarialfunktion mehr unterlagen und deren Endometrium das histologische Bild der Atrophie aufwies (Abb. 37). Auch Trams et al. (1973) fand am menschlichen Uterus (Endometrium) einen deutlich höheren Receptorgehalt in der Proliferationsphase als in der Sekretionsphase. Nach Limpaphayom et al. (1971) soll der Receptorgehalt in der Frühschwangerschaft besonders gering sein.Bei Ratten wiesen Demertogh et al. (1971) den geringsten Receptorgehalt zum Zeitpunkt der Brunst nach; am höchsten war er während des Diöstrus. Fenerty et al. (1970) ermittelten den höchsten Receptorbestand kurz vor beginnendem Östrus, der dann während des Östrus auf ein Minimum absank.Die Tatsache, daß es gelang, selbst über die Bestimmung der 8S-Komponente einen Zusammenhang zwischen dem Receptorgehalt des Uterus und dem endokrinen Funktionszustand des Organs herzustellen, deutet darauf hin, daß entweder ein relativ konstantes Verhältnis zwischen 8S- und 4,5S-Komponente des Östradiolreceptor besteht, oder daß die 8S-Komponente den überwiegenden Anteil des Gesamtreceptors ausmacht.

Ob sich der Gesamtreceptorgehalt des Cytosols zyklusabhängig ändert, läßt sich durch die vorliegenden Untersuchungen, die ausschließlich den freien Receptorbestand berücksichtigen, nicht übersehen. Fest steht lediglich, daß sich der Gehalt an freien Receptoren zyklusabhängig ändert. Durch hohe endogene Östradiolspiegel könnte der Receptor vermehrt abgesättigt sein und sich dadurch dem Nachweis entziehen. In Anbetracht der Tatsache, daß in der Sekretionsphase der geringste Receptorgehalt vorliegt, erhebt sich die Frage, ob Progesteron, das in der Sekretionsphase vermehrt gebildet wird, dafür verantwortlich ist. Es ist durchaus vorstellbar, daß Gestagene, obwohl sie keine direkte Affinität zum Östradiol-Receptor

haben, dennoch den Receptorbestand im Uterus beeinflussen. Nach Tseng und Gurpide (1975) mindert Progesteron und Norgestrel den Östradiolspiegel durch eine Steigerung der Aktivität der Östradiol-17ß-dehydrogenase, die die Umwandlung von Östradiol zu Östron katalysiert. Möglicherweise kommt es über ein vermindertes Substratangebot zu einer Verminderung des Receptorgehaltes. Nach Brenner et al. (1974) führt Progesteron zu einer Reduktion der Östradiolreceptoren im Tubenbereich der ovarektomierten Rhesusaffen, bei denen durch eine Sequentialgabe von Östradiol und Progesteron ein künstlicher Zyklus erzeugt wurde. Bei dem hochdifferenzierten Endometriumkarzinom der Frau stellten Pollow und Boquoi (1976) eine Abnahme der Östradiolreceptoren unter Gestagentherapie fest.

Darauf, daß Schwankungen des Receptorgehaltes nicht notwendiger Weise mit dem Endokrinium zusammenhängen, weisen die Untersuchungen von Hughes et al. (1976) hin. Danach zeigen Ratten Schwankungen des Receptorgehaltes in Abhängigkeit von der Jahreszeit. Der Receptorbestand war minimal in der Zeit zwischen August und September. Ferner ließ sich ein zirkadianer Rhythmus des Receptorgehaltes nachweisen; der Receptorgehalt sank in den Nachmittagsstunden ab. Diese tierexperimentellen Befunde fanden eine Parallele in human experimentellen Befunden. Mammacarcinome von Frauen in der Postmenopause, die im Mai oder November operiert wurden, zeigten geringere Receptorkonzentrationen als diejenigen, die während der übrigen Jahreszeit operativ entfernt wurden (Hughes et al. 1976). Diese Befunde schränken die klinische Bedeutung des quantitativen Nachweises von Steroidreceptoren zwangsläufig ein. Unabhängig von diesen Befunden haben sich jedoch durchaus klinisch relevante Beziehungen zwischen dem Östradiol-Receptorgehalt von Tumorgewebe und der Ansprechbarkeit des Tumor auf eine hormonelle Therapie ergeben.

V. Zusammenfassung

Nach den Untersuchungen von Wittliff et al. (1976) erscheint es nützlich, zur Beurteilung der Ansprechbarkeit von Mammakarzinomen der Frau auf eine Hormontherapie nicht nur den Gesamtreceptorgehalt im Tumorgewebe zu bestimmen, sondern zusätzlich die 8S-Komponente des Östradiolreceptors zu quantifizieren. Wittliff et al. fanden nämlich einen besonders engen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an 8S-Receptoren und dem Therapieerfolg bei einer Hormonbehandlung des metastasierenden Mammakarzinoms. Das Ziel dieser Studie war es deshalb, die Methode der Dünnschichtgelchromatographie zum Nachweis der 8S-Komponente der Östradiolreceptoren im menschlichen Myometrium zu optimieren. Danach sollte die 8S-Komponente des Östradiolreceptors durch kinetische Untersuchungen und Kompetitionsstudien charakterisiert werden, so daß sie mit dem in der Literatur beschriebenen Gesamtreceptor verglichen werden konnte.

Die Trennung von 8S- und 4S-Komponente des Receptors, bzw. die Trennung von 8S-Komponente und allen anderen Östradiol-bindenden Eiweißen gelang durch die Dünnschichtgelchromatographie mit Sephadex G 150 superfine. Die maximale Bindung zwischen Östradiol und der 8S-Komponente des Receptors stellte sich bei $4^{o}C$ und pH 7.0 nach zwei Stunden ein. Die zur Inkubation verwandten Puffer waren kaliumfrei. Mit steigender K^{+}-Konzentration des Inkubationsmediums dissoziierte die 8S-Komponente in niedermolekulare Einheiten. Die 8S-Komponente des Receptors erwies sich als hitzelabil; eine Erwärmung des Cytosols auf $40^{o}C$ zerstörte seine Bindungsfähigkeit. Glycerol und Äthanol, die des öfteren als Lösungsvermittler benutzt werden, hatten keinen Einfluß auf den Gehalt der 8S-Receptorkomponente im Cytosol. Zur Stabilisierung der 8S-Komponente des Receptors im Cytosol wurde 0,001molar Dithioerythrit dem

Tris-HCL-Puffer, mit dem die Präparation des Cytosols durchgeführt wurde, zugesetzt. Das Cytosol konnte so über 10 Tage tiefgefroren gelagert werden, ohne das ein Abfall der spezifischen Bindung zu verzeichnen war.

Bei der Auswertung der Konzentrationsbindungsstudien nach Scatchard ließ sich zeigen, daß nur eine einzige 8S-Rezeptorklasse im Cytosol vorhanden war. Die Affinität der Bindung erwies sich mit einer Assoziationskonstanten von im Mittel $2,07 \times 10^{8}$ l/Mol als sehr hoch. Die Bindungskapazität der 8S-Komponente des Östradiolreceptors im Cytosol des humanen Myometriums lag im Durchschnitt bei $7,25 \times 10^{-14}$ Mol/mg Protein bzw. $22,0 \times 10^{-14}$ Mol/mg DNA.

Kompetitionsstudien ließen auf eine hohe Stereospezifität der Bindung an die 8S-Komponente schließen.Lediglich Östron, Östriol und Äthinylöstradiol hatten eine ähnlich hohe Affinität zur 8S-Komponente des Östradiolreceptors wie Östradiol. Dagegen war die Affinität von Mestranol, Diäthylstilböstrol und Nafoxidine deutlich geringer; Mestranol wies die geringste Affinität auf. Die synthetischen Gestagene Norgestrel, Cyproteron, Norethisteron und ihre Acetate zeigten genau wie Progesteron keine Affinität zur 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Dihydrotestosteron und die 3,17 - Stereoisomere des 5α -Androstandiols wirkten ebenfalls nicht östrogenverdrängend an der 8S-Komponente des Östradiolreceptors. Auch Glucocorticoide wie Cortisol und Dexamethason wiesen keine Affinität zur 8S-Komponente des Östradiolreceptors auf. Die Herzglycoside Digoxin und Digitoxin sowie eine Reihe ihrer Metabolite wirkten ebenfalls nicht östrogenverdrängend. Dieses Ergebnis ist von besonderer Bedeutung angesichts der in der Klinik immer wieder gemachten Beobachtung, daß die Digitalisierung älterer Patienten mit östrogenartigen Effekten einhergehen kann.

Wurde die Konzentration der 8S-Komponente des Östradiolrecep-
tors im Cytosol des humanen Myometriums der Ovarialfunktion
zugeordnet, so zeigte sich in der Proliferationsphase ein
höherer Receptorbestand als in der Sekretionsphase. Am höch-
sten war der Receptorgehalt des Cytosols von Frauen, deren
regelmäßige Ovarialfunktion erloschen war.

VI. Literatur

Anderson, J.N., Peck, E.J., Clark, J.H.:
Estrogen-induced uterine responses and growth relationship to receptor estrogen binding by uterine nuclei.
Endocrinology 96:160, 1975

Barnea, A., Gorski, J.:
Estrogen induced protein. Timecourse of synthesis.
Biochemistry 9:1899, 1970

Biochemisches Taschenbuch
ed.H.M. Rauen, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956

Brecher, P.I., Numata, M. DeSombre, E.R., Jensen, E.V.
Conversation of uterine 4S estradiol-receptor complex to 5S complex in a soluble system.
Fed. Proc. 29:249, 1970

Brenner, R.M., Resko, J.A., West, N.B.:
Cyclic changes in oviductal morphology and residual cytoplasmic estradiol binding capacity induced by sequential estradiol-progesteron treatment of spayed rhesus monkeys.
Endocrinology 95:1094, 1974

Brökelmann, J.:
Biochemische und morphologische Veränderungen im Uterus nach Östradiol-Gabe.
Fortschr. Med. 95:2387, 1977

Brush, G.M., Taylor, R.W., King, R.J.B.:
The uptake of (6,7-^{3}H) oestradiol by the normal human female reproductive tract.
J. Endocrinol. 39:599, 1967

Burton, K.:
A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaktion for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid.
Biochem. J. 62:315, 1956

Clark, J.H., Gorski, J.:
Estrogen receptors: an evalution of cytoplasmic-nuclear interactions in a cell-free system and a method of assay.
Biochim. Biophys. Acta 192:508, 1969

Cleland, W.W.:
Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups.
Biochemistry 3:480, 1964

Crocker, S.G., Milton, P.J.D., King, R.J.B.:
Uptake of (6,7-^{3}H) oestradiol-17β by the normal and abnormal human endometrium.
J. Endocrinol. 62:145, 1974

DeAngelo, A., Gorski,J.:
Role of RNA-synthesis in the estrogen induction of a specific uterine protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66:693, 1970

DeHertogh, R., Ekka, E., Vanderheyden, I., Hoet, J.J.:
In vivo observations on reversible binding of estradiol-17β, 6,7,-^{3}H in rat uterus. Measurement of a "biological exchange constant" and of the "tissue capacity".
Endocrinology 88:165, 1971

Dische, Z.:
Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktion.
Mikrochemie 8:4, 1930

Doherty, J.E.:
The clinical pharmacology of digitalis glycosides: a review.
Am. J. Med. Sci. 255:382, 1968

Ellis, P.J., Ringold, H.J.:
The uterine estrogen receptor: a physicochemical study. in: The Sex Steroids. Molecular Mechanisms. K.W. Mc Kerns ed. Appleton-Croft-Century New York 1971, Seite 73

Erdos, T.:
Properties of a uterine oestradiol receptor.
Biochim. Biophys. Res. Commun. 32:338, 1968

Evans, L.H., Hähnel, R.:
Distribution of oestrogen receptor in cell fractions of human uterine tissue.
J. Endocrinol. 56:503, 1973

Evans, L.H., Martin, J.D., Hähnel, R.:
Estrogen receptor concentration in normal and pathological human uterine tissue.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 38:23, 1974

Feherty, P., Robertson, D.M., Waynforth, H.B., Kellie, A.E.:
Changes in the concentration of high-affinity oestradiol receptors in rat uterine supernatant preparations during the oestrus cycle, pseudopregnancy, pregnancy, maturation and after ovarectomie.
Biochem. J. 120:837, 1970

Gabb, R.G., Stone, G.M.:
Uptake and metabolism of tritiated oestradiol and oestrone by the human endometrial and myometrial tissue in vitro.
J. Endocrinol. 62:109, 1974

Glascock, R.F., Hoekstra, W.G.:
Selektive accumulation of tritium-labelled hexoestrol by the reproductive organs of immature female goats and sheep
Biochem. J. 72:673, 1959

Gorski, J., Racker, B.:
Estrogen action in the uterus: the requisite for sustained estrogen binding in the nucleus.
Gynecol. Oncol. 2:249, 1974

Gschwendt, M., Hamilton, T.H.:
The transformation of the cytoplasmic oestradiol-receptor complex into the nuclear complex in a uterine cell-free system.
Biochem. J. 128:611, 1972

Hähnel, R.:
Properties of the estrogen receptor in the soluble fraction of human uterus.
Steroids 17:105, 1971

Hähnel, R., Twaddle, E., Ratajczak, T.:
The specifity of the estrogen receptor of human uterus.
J. Steroid Biochem. 4:21, 1973

Harrison,R.W., Toft, D.O.:
Estrogen receptors in chick oviduct.
Endocrinology 96:199, 1975

Henderson, S.R., Schalch, D.S.:
Estrogen receptors in the human uterus. Cell-free studies with the use of human uterine cytosol from pregnant, postpartum, and nonpregnant patients, correlated with the plasma estradiol-17ß levels.
Am. J. Obstet. Gynecol. 112:762, 1972

Huggins, C., Grand, L.C., Brillantes, F.P.:
Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear

hydrocarbons, and its suppression.
Nature 189:204, 1961

Hughes, A., Jacobson, H.I., Wagner, R.K., Jungblut, P.W.:
Ovarian-independent fluctuations of estradiol receptor levels in mammalian tissues.
Mol. Cell. Endocrinol. 5:379, 1976

Jensen, E.V., DeSombre, E.R., Hurst, D.J., Kawashima, T., Jungblut, P.W.:
IV. Mode d'action des hormones intervenat dans la reproduction. Estrogen-receptor interactions in target tissues.
Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp. 56 (subbl.):547, 1967

Jensen, E.V., Jacobson, H.I.:
Basic Guides to the mechanism of estrogen action.
Rec. Progr. Horm. Res. 18:387, 1962

Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T.,Stumpf, W.E., Jungblut, P.W., De Sombre, E.R.:
A two step mechanism for the interaction of estradiol with the rat uterus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59:632, 1968

Jensen, E.V., Suzuki, T., Numata, M., Smith, S., DeSombre,E.R.:
Estrogen-binding substances of target tissues.
Steroids 13:417, 1969

Jungblut, P.W., Hätzel, I., DeSombre, E.R., Jensen, E.V.:
Über Hormon-"Receptoren". Die oestrogenbindenden Prinzipien der Erfolgsorgane.
Colloqu. Ges. Physiol. Chem. 18:58, 1967

Jungblut, P.W., Hughes, S., Hughes, A., Wagner, R.K.:
Evaluation of various methods for the assay of cytoplasmic oestrogen receptors in extracts of calf uteri and human

breast cancers.
Acta Endocrinol. (Kbh.) 70:185, 1972

Jungblut, P.W., Mc Cann, S., Görlich, L., Rosenfeld, G.C., Wagner, R.K.:
Binding of steroids by tissue proteins steroid hormone "receptors".
Research on Steroids IV, Pergamon Press Oxford 1970 S.213

Katzenellenbogen, B.S., Gorski, J.:
Estrogen action in vitro.
J. Biol. Chem. 247:1299, 1972

Katzenellenbogen, J.A., Johnson, H.J., Carlson, K.E.:
Studies on the uterine, cytoplasmic estrogen binding protein. Thermal stability and ligand dissociation rate. An assay of empty and filled sites by exchange.
Biochemistry 12:4092, 1973

Kaye, A.M., Sheratzky, D., Lindner, H.R.:
Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation.
Biochim. Biophys. Acta 261:475, 1972

Kordelaar, Van J.M.G., Broekman, M.M.M., Rossum, J.M.:
Interaction of contraceptive progestins and related compounds with the oestrogen receptor.
Acta Endocrinol. (Kbh.) 78:165, 1975

Korenman, S.G.:
Comparative binding affinity of estrogens and its relation to estrogenic potency.
Steroids 13:163, 1969

Korenman, S.G., Rao, B.R.:
Reversible dissaggregation of the cytosol-estrogen binding protein of uterine cytosol.

Proc. Natl.Acad. Sci. USA 61:1028, 1968

Krishnan, A.R., Hingorani, V., Laumas, K.R.:
Binding of ^{3}H-oestradiol with receptors in the human endometrium and myometrium.
Acta Endocrinol. (Kbh.) 74:756, 1973

Lee, C., Jacobson, H.I.:
Uterine estrogen receptor in rat during pubscence and estrus cycle.
Endocrinology 88:596, 1971

Lee, C., Oyasu, R., Chen, C.:
In vitro interaction of estrogen and prolactin on hormone-dependant rat mammary tumors.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148:224, 1975

Liedtke, R.:
Zur biochemischen Analyse von Ribonucleinsäuren bei Einfluß von Steroidhormonen.
Inaugural-Dissertation, Bonn 1972

Limpaphayom, K., Lee, C., Jacobson, H.I., King, T.M.:
Estrogen receptor in human endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol. 111:1064, 1971

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193:265, 1951

Markler, A., Eisenfeld, A.J.:
In vitro binding of ^{3}H-estradiol to macromolecules from the human endometrium.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 38:628, 1974

Mc.Guire, J.L., Bariso, C.D., Fuller, B.S., Mc Elrath, T.G., De Lahunte, J.M.:

Preliminary isolation of an estrogen specific binding macromolecule from the human uterus.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34:243, 1972

Mc. Guire, W.L., Horwitz, K.B., De La Graza, M.:
A biochemical basis for selecting endocrine therapy in human breast cancer.
in: Breast Cancer: Trends in Research and Treatment
ed. J.C.Heuson, W.H. Mattheiem, M. Rozencweig Raven Press
New York 1976, S. 177

Milgrom, E., Atger, M., Baulieu, E.-E.:
Acidophilic activation of steroid hormone receptors.
Biochemistry 12:5198, 1973

Milton, P.J.D., Taylor, R.W., Crocker, S.G.:
Oestradiol receptors in the cytoplasm of pre-cancerous and cancerous human endometrium.
Acta Endocrinol. (Kbh.) Suppl. 177:245, 1973

Musliner, T.A., Chader, C.J., Villee, C.A.:
Studies on oestradiol receptors of the rat uterus. Nuclear uptake in vitro.
Biochemistry 9:4448, 1970

Notides, A.C., Hamilton, D.E., Rudolph, J.H.:
Estrogen-binding proteins of the human uterus.
Biochim. Biophys. Acta 271:214, 1972

Peck, E.J. jr., DeLibero, J., Richards. R., Clark, J.H.:
Instability of uterine estrogen receptor under in vitro conditions.
Biochemistry 12:4603, 1973

Pollow, K., Boquoi, E.:
Oestradiol- und Progesteron-bindenden Receptoren sowie

17β-Hydroxysteroiddehydrogenase im Endometriumcarcinom der Frau vor und nach Gestagen-Behandlung.
Z. Krebsforsch. 86:231, 1976

Pollow, K., Lübbert, H., Boquoi, E., Kreuzer, G., Pollow, B.:
Characterization and comparison of receptors for 17β-estradiol and progesteron in human proliferative endometrium and endometrial carcinoma.
Endocrinology 96:319, 1975

Poortman, J., Vroegindewey-Jie, D., Thijssen, J.H.H., Schwarz, F.:
Relative binding affinity of androstane and C19-norandrostane-steroidsfor the estradiol receptor in human myometrial and mammary cancer tissue.
Mol. Cell. Endocrinol. 8:27, 1977

Puca, G.A., Brescaini, F.:
Decrease to complete loss of ability to bind estradiol by a soluble macromolecular fraktion of C3H mammary tumors.
Eur. J. Cancer 3:475, 1968

Puca, G.A., Brescani, F.:
Association constant and specifity of oestradiol-receptor interaction.
Nature 223:745, 1969

Puca, G.A., Nola, E., Sica. V., Brescani, F.:
Estrogen binding proteins of calf uterus. Partial purification and preliminary characterization of two cytoplasmic proteins.
Biochemistry 10:3769, 1971

Puukka, M.J., Kontula, K.K., Kauppila, A.J.I., Janne, O.A., Vihko, R.K.:
Estrogen receptor in human myoma tissue.
Moll.Cell. Endocrinol. 6:35, 1976

Ratajczak, T., Hähnel, R.:
The protection, stabilization and reactivation of estradiol receptors in human myometrial cytosol.
Biochim. Biophys. Acta 338:104, 1974

Sandborn, B.M., Held, B., Kuo, H.S.:
Specific estrogen binding proteins in human cervix.
J. Steroid Biochem. 6:1107, 1975

Scatchard, G.:
The attraction of proteins for small molecules and ions.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949

Steggles, A.W., King, R.J.B.:
The use of protamine to study (6,7-^{3}H) oestradiol-17β binding in rat uterus.
Biochem. J. 118:695, 1970

Stormshak, F., Leake, R., Wertz, N., Gorski, J.:
Stimulatory and inhibitory effects of estrogen on uterine DNA synthesis.
Endocrinology 99:1501, 1976

Szego, C.M.:
The lysosomal membrane complex as a proximate target for steroid hormone action.
in: The Sex Steroids. Molecular Mechanisms. K.W. McKerns ed. Appleton - croft-Century New York 1971, S. 1

Toft, D.O.:
A receptor molecule for estrogens: studies using a cell-free system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57:1740, 1967

Toft, D.O., Gorski, J.:
A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55:1574, 1966

Töpert, M., Zabel, J., Ziegler, M.:
Thin layer gel filtration as a method for routine steroid receptor binding studies.
Anal. Biochem. 62:514, 1974

Trams, G., Engel, B., Lehmann, F., Maass, H.:
Specific binding of oestradiol in human uterine tissue.
Acta Endocrinol. (Kbh.) 72:351, 1973

Tseng, L., Gurpide, E.:
Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins.
Endocrinology 97:825, 1975

Turkington, R.W.:
Prolaktin receptors in mammary carcinoma cells.
Cancer Res. 34:758, 1974

Vignon, F., Rochefort, H.:
Regulation of estrogen receptors in ovarian-dependent rat mammary tumors. I. Effects of castration and prolactin.
Endocrinology 98:722, 1976

Vreeburg, J.T.M., Schretlen, P., Baum, M.J.:
Studies in vitro on oestradiol high affinity binding in cytosols from different brain regions and pituitary of the adult male rat.
J. Endocrinol. 64:24P, 1975

Wagner, R.K.:
Characterization and assay of steroid hormone receptors and steroid-binding serum protein by agargel electrophoresis at low temperature.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353:1235, 1972

Wagner, R.K., Junglbut, P.W.:
Oestradiol. and dihydrotestosterone receptors in normal and neoplastic human mammary tissue.
Acat Endocrinol. (Kbh.) 82:105, 1976

Williams, D., Gorski, J.:
Kinetic and equilibrium analysis of estradiol in the uterus: a model of binding-site distribution in uterine cells.
Proc.Natl. Acad. Sci. USA 69:3464, 1972

Wiss. Tab. Geigy:
Ciba-Geigy, Basel 1973, 7. Auflage, 2. Nachdruck

Wittliff, J.L., Metha, R.G., Boyd, P.A., Goral, J.E.:
Steroid-binding proteins of the mammary gland and their clinical significance in breast cancer.
J. Toxicol. Environ. Health Suppl 1:231, 1976

Wyss, R.H., LeRoy Heinrichs, Wm., Herrmann, W.L.:
Some species differences of uterine estradiol receptors.
J. Endocrinol. Metab. 28:1227, 1969

Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. O. Bellmann danke ich für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. E. J. Plotz danke ich für die Möglichkeit des uneingeschränkten Arbeitens in den wissenschaftlichen Laboratorien der Universitäts-Frauenklinik Bonn

Herrn Dr. K. Lübke, Leiter der Allgemeinen Biochemie der Schering AG, Berlin, danke ich für die Einarbeitung in die Methodik.

Herrn Professor Dr. Dr. E. Gerhards, Leiter des Fachbereichs Tierexperimentelle Pharmakodynamik und Chemotherapie der Schering AG, Berlin, danke ich für die organisatorischen Hilfen.

Lebenslauf

Am 5. Mai 1953 wurde ich, Hannes Wenk, als Sohn des Studienrates Fritz Wenk und seiner Ehefrau Ruth in Solingen geboren. Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Volksschule Bünkenberg in Solingen, von 1963 bis 1971 den mathematisch naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums Schwertstraße in Solingen. Mein Medizinstudium begann ich 1971 an der Ruhr-Universität Bochum, wo ich 1972 die naturwissenschaftliche und 1973 die ärztliche Prüfung bestand. Zur Fortsetzung des Studiums wechselte ich an die Universität Bonn. Dort bestand ich 1975 den ersten und 1977 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Das praktische Jahr absolvierte ich am Klinikum der Universität Bonn in den Fachrichtungen Innere Medizin, Chirurgie und als Wahlfach Gynäkologie. 1978 bestand ich die ärztliche Prüfung. Im Mai 1978 schloß ich die Ehe mit Frl. Hildegard Dreger. Seit dem 1.7.1978 arbeite ich als Assisenzarzt in der orthopädischen Abteilung des St. Petrus Krankenhauses Bonn unter der Leitung von Dr. Dederich.

Hövelborn Druck und Verlag G.m.b.H. Seehofstraße 17, D-5200 Siegburg ∅ (02241) 6 53 00